



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士 學位論文

GPR119 리간드의 비알코올성 지방간 및 섬유화증에 대한 억제 효능

**Inhibition of hepatic steatosis and fibrosis by GPR119
ligands**

2015년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

양 진 원

국문요약

GPR119 리간드의 비알코올성 지방간 및 섬유화증에 대한 억제 효능

Inhibition of hepatic steatosis and fibrosis by GPR119 ligands

양 진 원

지도교수: 강 건 옥

비알코올성 지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 진행 경과에 따라 지방간(steatosis)을 시작으로 염증반응을 동반하는 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 나아가 진행 섬유화증(advanced fibrosis) 및 간 경변(cirrhosis)까지 포함하는 질환을 의미한다. 특히 지방간은 간세포 내에 중성지방 함량이 전체 간 무게의 5% 이상을 초과하는 병적 상태로서, 이는 인슐린 저항성 및 간 내 염증 반응을 유도하여 지방간염과 진행 섬유화증을 야기할 수 있다. 지방간 및 간 섬유화증에 대한 치료제는 없는 실정이며 현재까지 밝혀진 약물 표적 분자로는 완ちに 한계가 있다. 따라서 간세포의 손상 및 염증 반응의 원인이 되는 간 내 지질 축적과 만성적인 간질환에 따른 간 섬유화증을 조절할 수 있는 새로운 약물 표적 분자 발굴이 중요하다.

G protein-coupled receptor 119 (GPR119)는 항 당뇨 치료제로 개발되고 있는

신규 약물 표적 분자이다. 기존 연구결과에서 GPR119의 간 내 발현이 거의 관찰되지 않았으며, 현재까지 지방간 및 간 섬유화증에 대한 GPR119 리간드의 효능에 대해서는 평가되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 GPR119가 간세포 및 간 정상세포에 상시 발현되어 있음을 PCR 및 면역조직화학을 통하여 확인하였고, 간세포 및 간 정상세포에서의 GPR119 리간드의 효능에 대한 영향을 알아보고자 하였다.

GPR119 야생형(wild type, WT) 마우스의 1차 배양 간세포와 비교하여 GPR119 결손형(knock out, KO) 마우스의 1차 배양 간세포에서 지질 합성 효소(acetyl-CoA carboxylase, ACC 와 fatty acid synthase, FAS) 및 liver X receptor (LXR)리간드에 의하여 유도되는 sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)의 발현이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 비정상적인 간 내 지질 축적 과정에 GPR119가 관여함을 제시한다. 고당/고인슐린 노출에 의한 간세포의 SREBP-1 및 지질 합성 효소 발현 증가와 그에 따른 지질 축적이 GPR119 리간드 처리에 의하여 억제됨을 관찰하였다. 또한, LXR 리간드 처리 시 유도되는 SREBP-1 및 지질 합성 효소의 발현이 임상 진입 GPR119 리간드(MBX-2982, MBX)를 처리하였을 때 억제되는 것을 확인하였다. 다음으로 GPR119 WT과 GPR119 KO 마우스를 이용하여 GPR119 리간드에 의한 지방간 개선효과를 평가하였다. GPR119 WT 마우스에서는 GPR119 리간드 투여에 의하여 고지방 식이로 증가된 간 내 지질 축적과 SREBP-1 및 지질 합성 효소의 발현이 현저히 감소하였다. 하지만 GPR119 KO

마우스에서는 GPR119 리간드 처리에 의한 효과는 나타나지 않았다. 이는 GPR119 리간드의 간 내 지질 축적 억제가 GPR119를 매개하여 나타나는 효과임을 시사한다. 간 내 지질 축적 억제에 대한 신호 전달 경로로서 GPR119 리간드가 AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화를 통하여 SREBP-1을 억제함을 확인하였다. 이상의 결과는 GPR119 리간드가 지방간 치료에 대한 신규 약물 표적 분자로서 이용될 수 있음을 지지한다. 나아가, 세포기반 스크리닝법에 의하여 도출된 GPR119 리간드 후보물질을 활용하여, 고당/고인슐린 자극 시 증가하는 SREBP-1 및 지질 합성 효소 발현을 억제할 수 있는 신규 GPR119 리간드를 도출하였다.

다음으로 NAFLD의 마지막 단계인 간 섬유화 및 정상세포에 대한 GPR119 리간드의 효능에 대하여 평가하였다. 정상세포의 근섬유모세포(myofibroblast)로의 분화 시 유도되는 collagen I 발현과 transforming growth factor β (TGF β) 처리에 의하여 증가되는 collagen I과 TGF β 의 발현이 GPR119 리간드 처리에 의하여 억제됨을 정상세포에서 확인하였다. 또한, 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)투여에 의하여 유도되는 간 섬유화증 모델에서 GPR119 리간드의 개선 효과를 평가하였다. 간 섬유화 시 증가되는 α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I 및 TGF β 의 발현 및 TGF β 수용체 하위 활성화 신호인 Smad2/Smad3의 인산화가 GPR119 리간드 투여에 의하여 억제되었다. 다음으로, 정상 세포의 collagen I 및 TGF β 발현 억제는 GPR119 리간드의 AMPK 인산화에 의한 p300과 Smad3의 상호작용 억제를

통하여 일어남을 규명하였다. 또한 GPR119 리간드는 강력한 증식 인자인 platelet derived growth factor (PDGF)에 의한 정상세포의 증식을 감소시켰다. 나아가 PDGF에 의하여 증가되는 증식 유도 인자인 peptidyl prolyl isomerase (Pin1)의 발현이 GPR119 리간드에 의하여 감소함을 확인하였고, TGF β 1에 의하여 증가된 간 섬유화 유도 인자에 대한 GPR119 리간드의 억제 효과가 부분적으로 Pin1을 매개하여 나타나는 효과임을 확인하였다.

GPR119에 의하여 그 발현이 조절되는 Pin1은 이소머라제의 한 종류로서 만성 염증 질환 및 폐 섬유화증 (pulmonary fibrosis)에 관여하고, 암세포의 증식 및 전이를 유도한다고 알려져 있다. 하지만 간 섬유화증 조절에 있어 Pin1의 역할 및 그 분자적 기전에 대한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서는 면역염색법 및 immunoblot를 통하여 간암 환자의 간 조직 중 섬유화 발생 부위 및 정상세포에서 Pin1의 발현이 증가함을 확인하였고, Pin1이 간 정상세포의 활성화 과정에 미치는 영향을 연구하였다. 섬유화 발생 시 정상세포에서 Pin1의 발현이 증가하는 점에 착안하여 정상세포에 adenovirus를 이용하여 Pin1을 과발현 시킨 결과, 정상세포의 근섬유모세포 분화 시 증가 하는 α -SMA 발현이 증가하였다. 이와 반대로, Pin1 저해제 및 Pin1 short hairpin RNA (shRNA)을 이용한 Pin1 억제 시 α -SMA의 발현이 감소하였다. 이는 간 섬유화 진행 시 Pin1이 정상세포의 활성화 과정에 관여함을 시사한다. 또한 세포 외 기질 및 교원질을 축적시키는 핵심 인자인 TGF β 1 mRNA의 발현이 Pin1을 과발현 시킨 정상세포에서 증가함을

관찰하였다. 이와 반대로, Pin1 결손형 마우스 배아 섬유모세포 및 Pin1 저해제를 처리한 정상세포에서는 TGF β 1 mRNA의 발현이 감소하였다. 또한, reporter gene 분석 및 siRNA 도입을 통하여 Pin1의 TGF β 1 유전자 전사 조절 과정에서 c-Jun/activator protein-1 (AP-1)이 중요 전사인자로 작용함을 규명하였다. 나아가 Pin1 저해제 및 Pin1 shRNA를 통한 Pin1 억제 및 Pin1 결손형 마우스 배아섬유모세포에서 TGF β 1에 의해 유도되는 Smad2/Smad3의 인산화 및 하위조절 단백질인 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 발현 증가가 감소됨을 관찰하였다.

종합할 때, 본 연구에서는 GPR119가 간세포 및 간 정상세포에 발현되어 있음을 밝혔고, GPR119 리간드에 의하여 간세포의 지질 축적 억제 및 정상세포의 활성화에 의하여 야기되는 교원질의 축적을 억제시킬 수 있음을 규명하였다. 또한 GPR119에 의하여 조절되는 Pin1이 간 정상세포의 활성화 및 TGF β 1 유전자 발현 조절에 관여함을 규명하였다. 이는 GPR119가 비알코올성 지방간 질환 중 지방간 및 간 섬유화증에 대한 신규 약물 표적분자로서 효과적인 약물 작용점이 될 수 있음을 제시한다.

주요어: 지방간, 간 섬유화증, GPR119, Pin1, 신규 약물 표적 분자

학번: 2007-30471

목 차

국문요약.....	i
목차.....	vii
List of table	ix
List of figures	x
List of abbreviations	xi
 I. 서론	 1
 II. 실험재료 및 방법	
시약 및 재료.....	7
인체 조직 시료.....	8
세포주 배양.....	8
마우스 및 랫드로부터 간세포 및 간 정상세포 분리, 배양.....	9
세포 분획법.....	9
면역화학적 분석.....	10
Total RNA의 분리 및 RT-PCR 과 Real-time RT-qPCR 분석	11
형질 도입.....	13
아데노바이러스를 이용한 Pin1 감염.....	13
siRNA knockdown 실험	14
리포터 유전자 활성 분석.....	14
면역침강법.....	14
실험동물 및 식이	15
면역조직화학적 염색.....	16
혈액의 화학적 분석.....	16
중성지방측정.....	16
공초점 레이저 주사현미경 및 형광현미경 분석.....	17
MTT 분석.....	17

ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 분석.....	17
통계분석.....	18
 III. 실험 결과	
간세포에서 GPR119의 발현	19
GPR119의 지질 합성 경로 조절.....	21
GPR119 리간드의 지질 합성 억제 효과	23
GPR119 리간드의 지방간 억제 효과	26
GPR119 리간드의 AMPK 활성화를 통한 지질 합성 억제 효과.....	30
신규 GPR119 리간드의 지질 합성 억제 효과	33
간 정상세포에서 GPR119의 발현	37
GPR119 리간드의 간 정상세포 활성화 억제 효과	39
GPR119 리간드의 간 섬유화 억제 효과	42
GPR119 리간드의 AMPK 활성화를 통한 간 섬유화 억제 효과.....	46
GPR119의 간 정상세포 증식 억제.....	53
Pin1에 의한 간 섬유화 조절.....	55
Pin1의 TGFβ-Smad 신호전달 경로 조절.....	62
 IV. 고찰	
65	
 V. 참고문헌	
78	
 VI. 영문요약	
91	
 VII. Curriculum Vitae (Jin Won Yang)	
95	
 VIII. 감사의 글	
102	

List of table

Table 1. Effect of MBX on serum levels of ALT, glucose, total cholesterol and total triglyceride in GPR119-WT and -KO mice.....	29
Table 2. Effect of MBX on serum levels of ALT, AST, total bilirubin and direct bilirubin in CCL4-induced fibrosis model	45

List of figures

Figure 1. GPR119 expression in liver tissue and hepatocytes	20
Figure 2. Involvement of GPR119 in the regulation of lipogenesis.....	22
Figure 3. Role of GPR119 in sterol response element binding protein (SREBP)- 1- mediated hepatic lipogenic gene expression.....	25
Figure 4. Effects of GPR119 ligands on hepatic lipid accumulation in mice fed with high fat diet (HFD).....	28
Figure 5. Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in GPR119-dependent SREBP-1 down-regulation.....	32
Figure 6. Role of GPR119 analogues in SREBP-1-mediated lipogenic enzyme expression.....	36
Figure 7. Expression of GPR119 in hepatic stellate cells.....	38
Figure 8. Effects of GPR119 ligand on the activation of hepatic stellate cells...	41
Figure 9. Effects of GPR119 ligand on CCl4-induced hepatic fibrosis mice model.....	43
Figure 10. GPR119 ligand inhibition of TGF β 1-stimulated fibrogenic marker via AMPK activation.....	48
Figure 11. Effects of GPR119 ligand on TGF β 1-induced Smad association with p300 and Smad3 acetylation	52
Figure 12. Effect of GPR119 ligand on PDGF-induced proliferation, Pin1 expression and TGF β 1-stimulated fibrogenic marker via Pin1.....	54
Figure 13. Role of Pin1 in stellate cell activation and liver fibrosis.....	58
Figure 14. Role of Pin1 in c-Jun/AP-1-dependent TGF β 1 expression.....	61
Figure 15. Role of Pin1 in TGF β 1-dependent Smad2/3 activation and PAI-1 expression.....	64
Figure 16. A schematic diagram illustrating the mechanism by which GPR119 ligand alleviates hepatic steatosis and fibrosis.....	77

List of abbreviations

NALFD: non-alcoholic fatty liver disease
NASH: non-alcoholic steatohepatitis
FFA: free fatty acid
ECM: extra cellular matrix
ROS: reactive oxygen species
TGF- β 1: transforming growth factor- β 1
GPR119: G protein-coupled receptor 119
GLP-1: Glucagon-like peptide-1
GLP-2: Glucagon-like peptide-2
GIP: Glucose-dependent insulinitropic peptide
MBX: MBX-2982
GSK: GSK1292263
CB1: Cannabinoid Receptor 1
CB2: Cannabinoid Receptor 2
Pin1: Peptidyl prolyl isomerase
ACC: Acetyl-CoA carboxylase
AMPK: AMP-activated protein kinase
FAS: Fatty acid synthase
SCD 1: Stearoyl-CoA desaturase 1
SREBP-1: Sterol regulatory element binding protein-1
PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PC: Pyruvate carboxylase
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase,
T090: T0901317
LXR: Liver X receptor
DN-AMPK: Dominant negative-AMPK
CCl₄: Carbon tetrachloride
 α -SMA: α -smooth muscle Actin
ALT: Alanine transaminase

AST: Aspartate transaminase
T-BIL: Total bilirubin
D-BIL: Direct bilirubin
DMN: dimethylnitrosamine
shRNA: Short hairpin RNA
DPP-4: Dipeptidyl peptidase-4
PPAR- α : Peroxisome proliferator-activated receptor- α
AICAR: 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide
G α s: G α stimulatory
CRE: cAMP response element
PDGF: Platelet derived growth factor
EGF: Epidermal growth factor
FGF: Fibroblast growth factor
IGF: Insulin-like growth factor
AP-1: Activator protein-1

I. 서론

비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 음주와 관계없이 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물 등의 원인에 의하여 발병될 수 있으며, 진행 경과에 따라 지방간(steatosis) 및 염증반응을 나타내는 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 진행 섬유화증(advanced fibrosis) 및 간경변(cirrhosis)까지 포함하는 넓은 범위의 질환을 의미한다 (1). 고지방 및 고열량 식이 섭취에 따른 성인병 증가로 선진국 기준 성인 인구의 20-30%가 비알코올성 지방간 질환을 나타낸다. 그 중 2-3%가 비알코올성 지방간염 환자로 이행되는데, 조직학적으로 염증 및 섬유화 소견을 보이는 비알코올성 지방간염을 시작으로 간경변 및 간암으로 발전할 위험이 매우 높아지게 된다 (2). 비알코올성 지방간 질환 환자의 지방간은 의학적으로 중성지방 함량이 전체 간 무게의 5% 이상을 초과하는 병적 상태를 의미한다 (3). 이는 비만, 인슐린 저항성 및 글루코스 등에서 기인한 지질 합성의 증가에 따른 간세포 내 자유지방산(free fatty acid, FFA)의 축적을 특징으로 한다. 특히 증가된 간세포 내 유리지방산이나 콜레스테롤에 의한 지질독성(lipotoxicity) 및 증가된 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)이 지방간에서 지방간염으로 진행되는 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (4). 비알코올성 지방간 질환 환자에게 사용되고 있는 치료제는 인슐린저항치료제(pioglitazone) 등과 같이 위험인자의 교정을 통해 지방간을

개선하는 약제 및 vitamin E 등 항산화제가 권고되고 있다 (5). 그러나 기존에 사용되는 약제들은 장기간 사용에 대한 안정성 문제 및 본질적인 치료제가 아닌 증상 개선제로 이용되는 약물이므로 표적 효과로 볼 수 없으며, 현재까지 지방간을 치료할 수 있는 약물은 없는 실정이다.

비알코올성 지방간 질환의 마지막 단계인 간섬유화 및 간경변증은 대사성 질환, HBV, HCV 등 virus 감염, 독성물질의 노출 등 다양한 원인 인자의 만성적인 간세포의 파괴와 염증반응으로 인하여 간 내 세포 외 기질(extra cellular matrix, ECM)의 비정상적인 침착을 야기한다 (6). 간 섬유화의 표준 치료법으로서 간 이식만이 유일하며 임상적으로 승인된 치료 약물은 없는 실정이다 (7). 간 섬유화는 지속적인 간세포 손상에 따른 활성산소기(reactive oxygen species, ROS) 및 염증성 사이토카인 등의 분비에 의한 대식(쿠퍼)세포 및 다양한 염증 세포들의 활성화를 통하여, 간 성상세포(hepatic stellate cell)의 근섬유모세포(myofibroblast)로의 분화(transdifferentiation) 및 증식을 유도한다 (8). 이러한 성상세포 활성화는 간 섬유화를 유도하는 강력한 유도인자인 transforming growth factor β 1 (TGF β 1) 분비를 증가시키고, 이는 세포 외 기질의 비정상적인 침착을 일으킨다 (6). 따라서 간 섬유화 치료를 위한 성상 세포의 활성화 억제 및 그에 대한 새로운 약물 작용점의 발굴이 매우 중요하다.

G protein-coupled receptor 119 (GPR119)는 췌장의 베타세포 및 소장 of 장내분비세포인 K-세포와 L-세포에 주로 분포하는 것으로 알려져 있으며 당뇨병 치료제의 신규 타겟으로 제시되고 있다 (9, 10). 특히 췌장에서

GPR119 수용체의 활성화는 외부 글루코스 자극에 대한 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 기존의 당뇨병 치료제가 갖는 저혈당 유발효과가 없는 장점이 있다 (11). 소장에서 GPR119의 활성화는 L-세포에서 glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucagon-like peptide-2 (GLP-2), peptide YY의 분비 및 K-세포에서 glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)의 분비를 촉진하는 것으로 보고되어 있다 (12). 현재까지 개발 중인 GPR119 합성 리간드는 대부분 당뇨병의 차세대 치료제로 상당한 기대를 모으고 있으며, GPR119의 합성 리간드인 MBX-2982 (MBX)와 GSK1292263 (GSK)가 혈당강하를 촉진하는 신호와 연계되어 항당뇨 효능의 기전으로 임상 2상에 진입한 물질들로 가장 앞서가고 있는 상황이다 (13). 최근 보고에 의하면 췌장 및 소장 내 분포와 비교하여 그 발현이 상대적으로 낮지만 심장 및 근육 등 다른 말초조직에서 GPR119 발현이 관찰됨이 알려져 있다 (9, 14). 하지만 GPR119에 대하여 간 조직에서의 병태생리적 역할은 현재까지 알려진 바가 없다.

GPR119와 함께 GPR40 family receptor (GPR41과 GPR43), GPR84, GPR120 및 cannabinoid Receptor 1 (CB1) 및 cannabinoid Receptor 2 (CB2)가 자유지방산 및 지질 유도체들에 대한 수용체로서 보고되어 있다 (15). 그 중 GPR41, GPR43, GPR84, GPR120이 지방조직과 단핵구 및 대식세포에 발현되어 있으며 그에 대한 병태생리학적 역할이 규명되었고, 특히 지질계 유도체인 endocannabinoid에 대한 수용체인 CB1 및 CB2가 간세포, 대식세포 및 간

정상세포에서 발현하여 지방간 및 간 섬유화 조절에 관여함이 알려져 있다 (16). 그러나 다양한 지질계 유도체들이 GPR119의 내인성 리간드로 보고되어 있지만 GPR119의 지방간 및 간 섬유화에 대한 평가는 현재까지 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 인간 및 마우스의 정상 간 조직, 마우스의 간에서 분리한 1차 배양 간세포에서 GPR119의 발현을 확인하고 GPR119의 간 내 지질 합성(lipogenesis)에 대한 기능적 역할을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 GPR119 선택성 리간드를 이용하여 지질 합성 경로에 미치는 영향을 평가하였으며, GPR119 야생형(wild type, WT) 및 결손형(knock out, KO)마우스를 활용한 고지방 식이 유도 지방간 모델에서 GPR119 리간드의 항 지방간 효과에 대한 영향을 평가하였다. 즉 GPR119 및 그 리간드가 비알코올성 지방간에 대한 치료 효과가 있음을 규명함으로써, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료에 GPR119 리간드가 적합하게 적용될 수 있음을 제시하고자 한다.

나아가 자유지방산 및 지질 유도체들의 다양한 수용체가 간 내 존재하는 세포(간세포, 대식세포, 간 정상세포, 단핵구)들에서 발현하고 있고 그 중 지질 유도체인 endocannabinoid에 대한 수용체인 CB1 및 CB2가 간 정상세포에서 발현하여 간 섬유화 조절에 관여한다는 점에 착안하여, 인간의 간 내 섬유화 조직과 마우스의 1차 배양 간 정상세포에서 GPR119의 발현을 확인하고 정상세포의 활성화에 대한 GPR119의 기능적 역할을 알아보하고자

하였다. 또한 GPR119 리간드의 간 섬유화에 미치는 영향을 사염화탄소로 유도한 간 섬유화 동물모델을 이용하여 규명하고자 하였다.

다음으로 간 섬유화를 조절하는 주요 인자로서 peptidyl prolyl isomerase (Pin1)을 제시한다. Pin1은 유사분열을 조절하는 효소로서 프롤린 링 측면에 인산화된 세린/쓰레오닌(serine/threonine) 잔기를 인식하여, 펩타이드 본드의 cis-trans 이성질화를 촉진하는 프롤릴 이소머라제(prolyl isomerase)이다 (17). Pin1에 의한 펩타이드 본드의 cis-trans 이성질화는 Tau, p53, c-Jun, NF- κ B, c-Myc 등 세포 신호 전달 체계를 조절하는 단백질들의 구조적 변화를 촉진하고, 단백질들간의 상호 작용 및 세포 내 위치변경, 단백질 분해의 변화를 통해서 효소의 촉매 활성(catalytic activity)을 조절한다 (17, 18). Pin1은 전립선, 유방, 구강, 폐 및 직장 등 다양한 암세포에서 그 발현이 현저히 증가되어 있으며, 암세포의 증식, 혈관신생, 전이에 중요한 상피중간엽세포 이행 등에 관여한다고 보고되어 있다 (19). 특히 Pin1은 혈관평활근 세포의 증식을 유도함이 알려져 있으며, Pin1 억제 시 염증에 의한 폐 교원질(pulmonary collagen) 침착이 감소됨이 보고되어 있다 (20, 21). 또한 Pin1은 활성화된 면역세포에서 섬유화를 유도하는 성장인자 및 사이토카인(cytokine)의 조절을 통해 면역반응을 조절한다 (22). 하지만 Pin1의 간 섬유화 조절에 대한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 간 섬유화 과정에서 Pin1 조절이 간 정상세포의 활성화 과정과 TGF β 1 유전자 발현 조절 또는 하위 신호 전달 경로에 미치는 영향을

평가하고자 하였다. 나아가 GPR119 리간드의 간 정상세포 증식 및 간 섬유화 유도 인자 억제가 Pin1과 관련 여부를 평가하고자 하였다.

이상의 연구배경에 근거하여 본 연구에서는 비알코올성 지방간 질환 중 지방간 및 간 섬유화 예방 및 치료를 위하여 새로운 약물 작용점을 발굴하고자 하였다. 구체적인 세부 연구 목표는 다음과 같다.

1) 인간과 마우스의 정상 간 조직 및 마우스에서 1차 배양한 간세포에서 GPR119의 발현을 알아보하고자 하였다.

2) GPR119 결손형 마우스를 활용하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 GPR119 리간드가 지질 합성 경로 조절에 관여하는지 연구하였다.

3) 인간의 간 섬유화 조직 및 마우스에서 1차 배양한 간 정상세포에서 GPR119 및 Pin1의 발현을 알아보하고자 하였다.

4) GPR119리간드의 간 섬유화 과정에 미치는 영향과 그에 대한 분자적인 기전 및 Pin1의 관련성을 밝히하고자 하였다.

5) Pin1의 TGF β 1의 유전자 발현 및 간 정상세포의 활성화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

II-1. 시약 및 재료

Anti-fatty acid synthase (FAS), anti-sterol regulatory element binding protein-1(SREBP-1) 그리고 anti-plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 항체는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 제공받았다. phospho-SREBP-1c (ser372), AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK, acetyl-CoA carboxylase (ACC), phospho-ACC, p-Smad2, p-Smad3, Smad2, Smad3, acetylated lysine 그리고 lamin A/C, Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG 그리고 Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다. Anti-GPR119, anti-collagen I 항체는 Abcam plc. (Cambridge, MA, USA)에서 제공받았다. Pin1, p300, c-Myc, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), pyruvate carboxylase (PC) 그리고 anti-goat IgG 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. Actin, smooth muscle Ab-1, anti- β -actin 항체, insulin 그리고 glucose는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 항체, T0901317 (T090), H-89 그리고 compound C는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 제공받았다. MBX와 GSK는 medchem express (Monmouth County, NJ, USA)제품을 이용하였다. plasmids encoding dominant negative form of AMPK (D157A)는 Dr. J. Ha (Kyung Hee University, Korea) 에게 제공받아 사용하였다.

pCRE (cAMP-responsive element)-Luc는 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 제공 받았다. Dimethylsulfoxide 및 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical (St. Louis, MO)에서 구매하였다.

II-2. 인체 조직 시료

조선대학교 병원(Gwangju, South Korea)에서 외과적 수술에 의한 암 제거 수술을 받은 간암 환자로부터 기증받은 간암 조직과 주변 정상 조직 시료를 사용하였다. 실험 프로토콜은 1975 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인을 준수하였고, 모든 환자의 동의서를 받았으며 IRB 승인을 획득하였다(CHOSUN 2013-04-005).

II-3. 세포주 배양

Pin1 야생형(wild type, WT)과 결손형(knock out, KO) mouse embryo fibroblast (MEF) 세포주는 Dr. Lu (Beth Israel Deaconess Medical Center, MA)로부터 공여받았다. LX-2 인간 간성상세포주는 Merck Millipore (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. HepG2 인간 간암세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였다. HepG2는 5% CO₂가 공급되는 37°C 의 배양기에서 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin 및 50 µg/ml streptomycin 을 함유한 Low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에서 계대 배양하며 실험에 사용하였다. LX-2는 2% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin 및 50 µg/ml

streptomycin 을 함유한 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium 배지를 사용하였다.

II-4. 마우스 및 랫드로부터 간세포 및 간 정상세포 분리, 배양

세글렌 등의 방법 (23)에 따라 간세포를 분리하였고, Nycodenz를 이용한 density gradient방법 (24)으로 간 정상세포를 부유시켜 분리하는 방법으로 획득하였다. 수컷 SD랫드, 수컷 C57BL/6 마우스 및 수컷 GPR119 WT 마우스와 GPR119 KO 마우스로부터 간세포 및 간 정상세포를 분리하였다.

II-5. 세포 분획법

전세포 추출액 (whole cell lysate) 및 핵 분획 (nuclear fraction)은 기존 방법에 따라 분리하였다 (25, 26). 전세포 추출액은 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척한 세포에 용해완충액 [10 mM Tris-HCl, pH 7.1, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol 및 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]을 넣고 30분 동안 4°C에서 용해한 후 14,000g에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 핵 분획을 얻기 위해 세포에 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 0.5 mM PMSF를 포함하는 저삼투압 완충용액을 넣고 4°C에서 10 분간 반응하였다. 10% Nonidet P-40 넣고 10초간 vortexing 후 13,000rpm에서 3 분간 원심분리한 후 취한 상등액을 제거하고 저삼투압완충용액으로 3회

세척한 후, 침전물에 고삼투압 완충용액 [20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 1 mM PMSF]을 넣은 후 다시 4°C에서 10분간 vortexing 후 20분 동안 반응시켰다. 13,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 취해 핵 분획으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford assay 방법에 따라 PRO-MESURE™ protein measurement solution (iNtRON Biotechnology, South Korea)의 단백질 정량 키트를 사용하여 정량 하였다.

II-6. 면역화학적 분석

본 연구실의 확립된 방법에 따라 겔 전기영동 장치(Mighty Small SE 250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco)를 사용하여 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다 (27). 세포의 용해분획을 시료 희석 완충용액[63 mM Tris(pH.6.8), 10 % 글리세롤, 2 % SDS, 0.0013 % 브로모페놀 블루, 5 % β-머캅토에탄올]에 희석한 후 8 ~12 % 겔을 사용하여 전극 완충용액(1 ℓ 용액 중 Tris 15 g, 글리세린 72 g, SDS 5 g 함유) 내에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔을 전이용 전기영동 장치를 이용하여 전이완충용액(25 mM Tris, 192 mM 글리세린, 20 % v/v 메탄올(pH.8.3)) 내에서 40 mAmps로 3시간 동안 나이트로셀룰로오즈 막에 단백질을 전이시켰다. 1차 항체로 상기 나이트로셀룰로오즈 막에 반응시킨 후 여기에 2차 항체로 양고추냉이 퍼옥시다제-접합 염소 항-토끼 IgG (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG)와 양고추냉이 퍼옥시다제-접합 염소

항-마우스(anti-mouse) IgG를 1시간 동안 반응시키고 ECL 검출 시스템(ECL chemiluminescence system, Amersham, Gaithersburg, MA)을 사용하여 발색하였다.

II-7. Total RNA의 분리 및 RT-PCR 과 Real-time RT-qPCR 분석

TRIZOL을 사용하여 세포에서 추출한 총 RNA (1µg)와 Maxime RT PreMix Kit (intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 cDNA를 얻었다. RT-PCR의 경우 제조사의 방법에 따라서 Maxime™ PCR PreMix Kit를 사용하여 타겟 유전자를 PCR 법에 의해 증폭한 후 2% agarose gel에 전기영동하여 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 실험에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: mouse GPR119 (sense: 5'-TGTCCTAACCATCCTCATCA-3', antisense: 5'-ATAGCCACGCCAATCAAG-3') and mouse S18 ribosomal protein (S18r) genes (sense: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3', antisense: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'). human GPR119 (sense: 5'-GGCTGTGGTTAGTGTCTTAC-3', antisense: 5'-ACGAAGTGAGGGTGAAATAC-3') and human S16 ribosomal protein (S16r) 5'-TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC-3' (sense) and 5'-CGTTCACCTTGATGAGCCCATT-3' (antisense). Real-time RT-qPCR의 경우 합성된 cDNA를 SYBR green dye (Bio-rad)를 사용하여 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 기계에서 측정하였다. 유전자의 C_p 값을 S18r 유전자의 C_p 값으로 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다. 실험에 사용한 프라이머 서열은 다음과 같다: human

ACC 5'-GCTGCTCGGATCACTAGTGAA-3' (sense) and 5'-
 TTCTGCTATCAGTCTGTCCAG-3' (antisense); human SCD-1 5'-
 CCTCTACTTGGAAGACGACATTCGC-3' (sense) and 5'-
 GCAGCCGAGCTTTGTAAGAGCGGT-3' (antisense); human FAS 5'-
 CCGCTTCCGAGATTCCAT-3' (sense) and 5'-GCAGTCAGGCTCACAAAC-3'
 (antisense); human S16r 5'- TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC-3' (sense) and 5'-
 CGTTCACCTTGATGAGCCCATT-3' (antisense); mouse FAS 5'-
 ATCCACTCAGGTTTCAGG-3' (sense) and 5'- AGGTATGCTCGCTTCTCT-3'
 (antisense); mouse SCD-1 5'-CTGGCTGGAGAGTCATCA-3' (sense) and 5'-
 AACGAGGACGACAATACAATC-3' (antisense); mouse ACC 5'-
 TCTGGTCATACTTCGCTCTAT-3' (sense) and 5'-GCCTGTCATCCTCAATATCG-3'
 (antisense); mouse S18r 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' (sense) and 5'-
 CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (antisense). mouse colla1 5'-
 ACTGCAACATGGAGACAGGTCAGA-3' (sense) and 5'-
 ATCGGTCATGCTCTCTCCAAACCA-3' (antisense); mouse TGFβ1 5'-
 CTTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-3' (sense) and 5'-
 CACGATCATGTTGGACAACT GCTCC-3' (antisense); human TGFβ1 5'-
 CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3' (sense) and 5'-GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3'
 (antisense); human collA1 5'-AACATGACCAAAAACCAAAAGTG-3' (sense) and 5'-
 CATTGTTTCCTGTGTCTTCTGG-3' (antisense); rat TGFβ1 5'-

TCGGGAGAGAGGAGGACTTTG-3' (sense) and 5'-GGCTTGCGACCCACGTAGTA-3' (antisense); rat GAPDH 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' (sense) and 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (antisense).

II-8. 형질 도입

세포 배양 용기에서 약 50–70% 배양된 세포를 TOM (hyclone)배지에서 FuGENE HD reagent (Roche, Nutley, NJ)를 사용하여 플라스미드를 세포 내 도입하였다. 형질도입은 플라스미드 1 µg당 3 µl의 FuGENE HD reagent과 1 ml의 TOM 배지에서 반응시켜서 세포에 넣어주고 약 6시간 반응시켜 형질 도입하였다. 형질 도입되는 플라스미드의 총량을 보정하기 위하여 대조군 세포에 과발현 플라스미드의 backbone만을 가지는 플라스미드(mock-transfection)를 형질도입하였다. 형질도입 후 배양배지에 18시간 정도 안정화시킨 후 약물을 처리하였다.

II-9. 아데노바이러스를 이용한 Pin1 감염

Pin1을 인코딩하는 아데노바이러스는 Dr. Il je Cho (Daegu Haany University, Gyeongsangbuk-do, South Korea)로부터 공여받았다. 재조합 아데노바이러스는 pAd/CMV/V5-DEST gateway plasmid를 주형으로 하였다 (Invitrogen, Carlsbad, CA). 아데노바이러스를 감염다중도(multiplicity of infection) 50으로 세포에 10% fetal bovine serum을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium에서

6시간 동안 감염시켰으며, green fluorescent protein을 발현하는 아데노바이러스를 대조군으로 사용하였다.

II-10. siRNA knockdown 실험

선택적 siRNA는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 특정 단백질의 발현저해를 위하여 Fugene HD reagent 제조사의 권장방법에 따라 세포에 siRNA (100 pmol)를 처리하여 형질 도입하였다. 발현저해 효과는 면역화학적 분석법을 통해 확인하였다.

II-11. 리포터 유전자 활성 분석

리포터 유전자 분석은 dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI)을 사용하였다. 세포주를 배양하여 luciferase construct를 주입한 세포를 Fugene HD reagent와 함께 형질도입 시켰다. 실험 종료 후 세포를 용해시키고 루미노스캔 (Luminoscan) 을 사용하여 활성도를 측정하였다.

II-12. 면역침강법

총분획 단백질과 해당항체를 4°C 에서 12시간 이상 반응하였다. 항원-항체 결합체를 protein G-agarose와 4°C 에서 2시간동안 반응시킨 후 침전시켜 2XLaemmli 완충액과 반응시켰다. 추출된 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

II-13. 실험동물 및 식이

모든 실험에서 6주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 $55 \pm 5\%$ 의 습도, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 및 환기가 조절된 서울대 약대 동물실험 연구동에서 1주일 간 사육하여 환경에 적응시킨 후, 난괴법(randomized block design)에 따라 실험에 사용하였으며 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 특별한 언급이 없는 한 물과 고형사료를 자유로이 공급하였다.

A. 고지방 대조 식이에 의한 지방간 유도모델.

비만 유도 식이는 고지방 대조 식이(high fat diet, HFD: 60% 지방 칼로리(fat calorie), Research diets, D12492, 미국)이다. 6주령의 수컷 GPR119 WT 마우스와 GPR119 KO 마우스[KOMP Repository (Project ID: VG10098) (Davis, CA, USA)]를 이용하여 12주간 투여함으로써 지방간 동물모델을 확립하였다. 마우스에 고지방식을 투여하고 6주 후에 GPR119 리간드(10 mg/kg)를 40% PEG400에 현탁하여 고지방식과 병행하면서 1일 1회 매주 5일 경구로 투여하였다. 대조군으로는 Vehicle 투여군을 사용하였다.

B. 사염화탄소(CCl_4) 및 dimethylnitrosamine (DMN)에 의한 간 섬유화 유도 모델.

6주령의 수컷 C57BL/6 마우스(중앙실험동물, 서울)를 3주 동안 사염화탄소(1ml/kg) 주당 2회 투여하여 간 섬유화를 유발하였고 동시에 GPR119 리간드(10 mg/kg)를 40% PEG400에 현탁하여 1일 1회 매주 5일 경구로 투여하였다. DMN에 의한 간 섬유화 유도 모델은 DMN (10mg/kg)을 주당 3회

투여하여 간 섬유화를 유발하였다. 대조군으로는 Vehicle 투여군을 사용하였다.

II-14. 면역조직화학적 염색

간 검체를 절편으로 만들었고 조직 절편은 10% buffered neutral formalin 으로 고정하고 파라핀에 매몰하였다. 이후 4 μ m 두께로 절단하여 슬라이드에 표본을 고정시키고 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 하였다. Oil Red O 염색을 위해 동결시킨 간 조직을 4 μ m 두께로 절단한 후 슬라이드에 표본을 고정시키고 Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO) 시약으로 염색하여 광학현미경을 사용하여 관찰하였다. Hydroxyproline 정량 및 sirius red 염색으로 간 내 섬유화 정도를 평가하였다.

II-15. 혈액의 화학적 분석

혈청의 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glucose, total cholesterol, total triglyceride, total bilirubin (T-BIL) 와 direct bilirubin (D-BIL)은 자동 혈액 분석기인 Spectrum® [(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)]를 사용하여 분석하였다.

II-16. 중성지방측정

중성지방은 Triglyceride Quantification Kit (Catalog#b65336, Abcam, Cambridge, MA)을 이용하여 측정하였다.

II-17. 공초점 레이저 주사현미경 및 형광현미경 분석

GPR119의 세포 내 위치를 관찰하기 위하여 기존의 보고된 방법에 따라 면역세포학적 염색법에 따라 염색하였다. 면역염색화학 반응을 시킨 조직 슬라이드 또는 chamber slide에 배양한 세포를 형광현미경 및 각각의 활성화과장 및 여기과장에서 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 형광을 관찰하였다.

II-18. MTT 분석

세포독성을 측정하기 위하여, 세포를 96-well dish (1×10^4 세포/well)에 깔았다. 약물을 처리한 뒤, MTT 시약 (0.25 mg/ml)을 4시간 동안 반응시켜 살아있는 세포를 염색하였다. Formazan 크리스탈을 dimethyl sulfoxide로 용해시켜, ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC) 기계를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

II-19. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 분석

Chromatin 단편은 EZ-ChIP™ kit Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Germany)를 이용하여 추출하였다. 처리된 세포의 배양 용기에 직접 최종 1% 농도가 되게 formaldehyde를 상온에서 10분간 처리하여 세포를 고정시킨 후, 세포를 인산완충용액으로 세척하였다. 세포를 1% SDS와 10mM EDTA가 포함된 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.1)에서 초음파 파쇄하여 용해시킨 후,

10,000g에서 10분간 원심분리하여 세포 추출액을 얻었다. 세포 추출액에 10배의 ChIP dilution buffer [Tris-HCl (16.7 mM, pH 8.1), 167mM NaCl, 1.2mM EDTA, 0.01% SDS 및 1.1% Triton X-100]를 사용하여 희석한 후, protein A-agarose를 가하여 비특이적 반응물을 제거하였다. 10%의 용액을 input control로 사용하기 위하여 따로 분주하여 보관하였다. 1 µg의 항체 또는 preimmune IgG를 넣어 4°C에서 12시간 동안 반응시키고 protein A-agarose bead를 넣어 추가로 2시간 동안 면역침강(immunoprecipitation)시켰다. 침전시킨 항원-항체 결합체를 세척한 후, 5M NaCl을 최종 200mM이 되도록 가하여 65°C에서 4시간 동안 고정되었던 chromatin-항원-항체 복합체를 해리시켰다. DNA를 phenol-chloroform 추출법에 의해 추출하고, chromatin 단편을 Real time-qPCR법에 의해 증폭하였다. Human *coll1a1* 프로모터 내의 p300의 결합부위를 위한 특이적 primer로서 (sense: 5'- CATTCCTCAGCTCCCCTCTCT-3', antisense: 5'- AGTCTACGTGGCAGGCAAGG-3')을 이용하였다.

II-20. 통계분석

One way analysis of variance, unpaired 또는 paired Student's *t*-test로 그룹간 유의성을 평가하였다. 데이터는 산술평균 ± S.E. 또는 산술평균 ± S.D.로 표기하였으며 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$ 을 기준으로 하였다.

III. 실험 결과

1. 간세포에서 GPR119의 발현

인간 및 마우스의 정상 간 조직에서 GPR119의 발현을 측정하였다. 면역조직화학염색을 수행하여 관찰한 결과, 인간 및 마우스의 정상 간 조직에서 GPR119의 발현을 확인하였다 (Fig. 1A). Conventional PCR 결과에서도 GPR119의 발현이 알려진 췌장의 GPR119 mRNA 발현과 함께 마우스의 1차 배양 간세포에서 GPR119 mRNA의 발현을 확인하였고 면역조직화학염색을 통해서도 그 발현을 관찰하였다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 GPR119가 간세포에서의 그 기능적 역할이 있음을 시사한다.

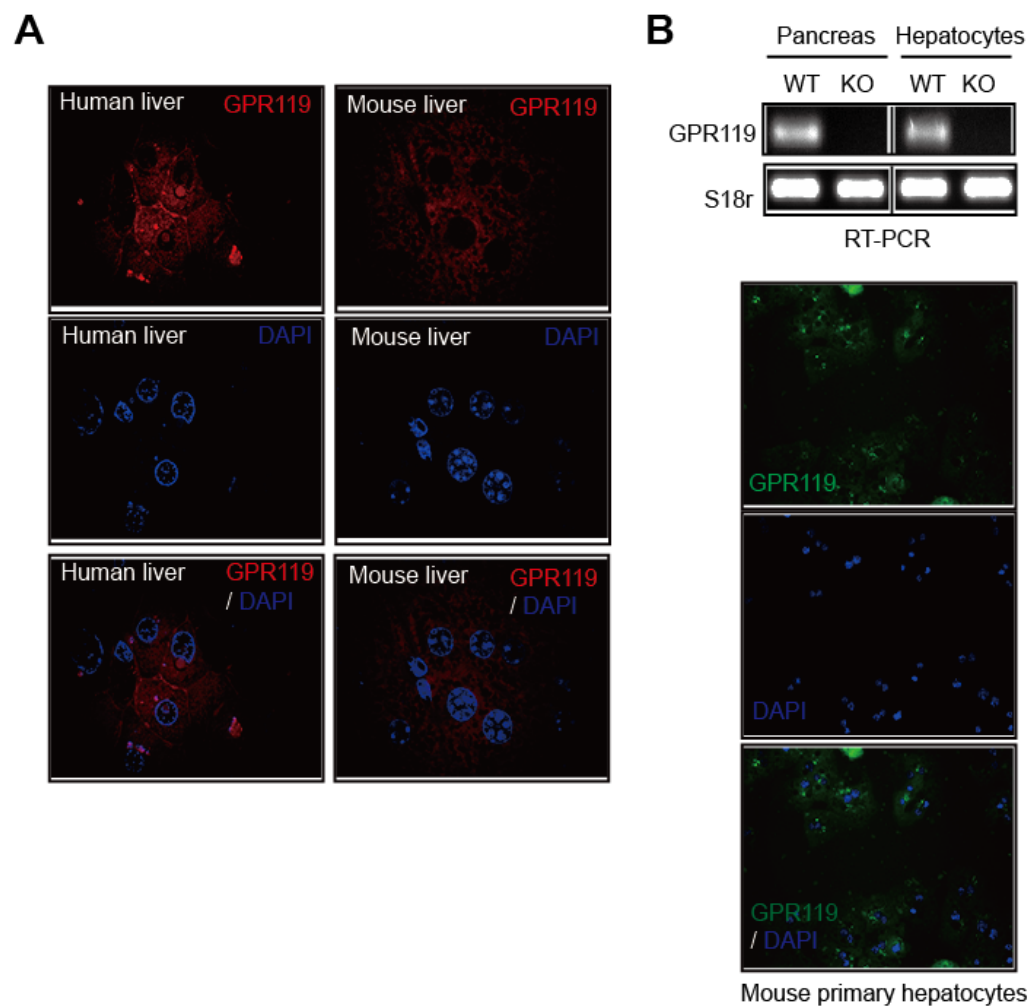


Fig. 1. GPR119 expression in liver tissue and hepatocytes.

(A) Confocal images of GPR119 in human and mouse liver.

(B) mRNA levels and expression of GPR119 in primary mouse hepatocytes.

2. GPR119의 지질 합성 경로 조절

지방간을 일으키는 비정상적인 지질 합성은 일련의 효소계의 발현 증가를 통해 일어난다. 특히 지질 합성 경로의 속도조절효소(rate limiting enzyme)인 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) 및 stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)의 발현은 전사인자인 sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)에 의해서 조절되며, SREBP-1의 활성화는 상기 효소계의 발현을 증가시킴으로써 간 내 지질 축적을 촉진하게 된다 (28, 29). GPR119의 기능적 역할을 확인하고자 GPR119 야생형 마우스와 GPR119 결손형 마우스의 간에서 각각 분리한 1차 배양 간세포에서 주요 지질 합성 효소인 FAS와 ACC의 발현을 측정하였다. 그 결과, GPR119 결손형 마우스의 1차 배양 간세포에서 그 발현이 현저히 증가되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2A). SREBP-1의 반응성을 살펴보기 위하여 SREBP-1 활성화 신호로 잘 알려진 liver X receptor (LXR) 리간드인 T0901317 (T090)를 이용하였다. 그 결과, GPR119 결손형 마우스의 1차 배양 간세포에서 T090에 의해 유도되는 SREBP-1의 발현이 GPR119 야생형 마우스의 1차 배양 간세포에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2B). 이상의 결과는 GPR119가 간세포에서 지질 합성 경로 조절에 관여함을 시사한다.

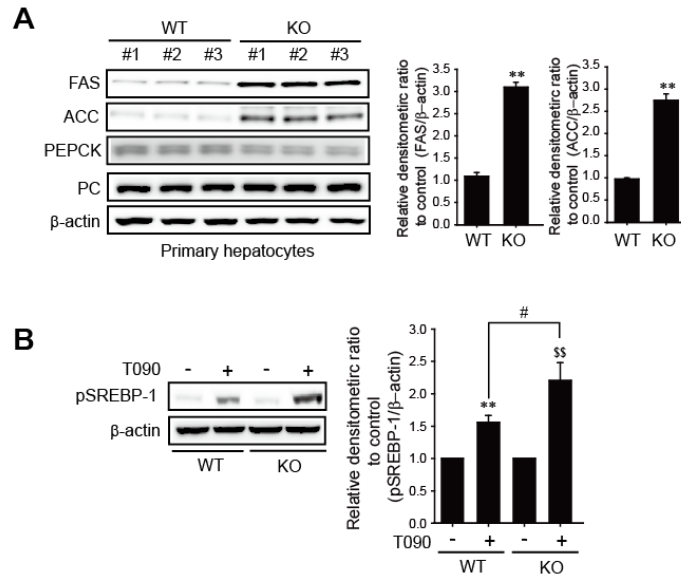


Fig. 2. Involvement of GPR119 in the regulation of lipogenesis.

(A) Western blot analyses of lipogenic enzymes (FAS, ACC) and gluconeogenic enzymes (PEPCK, PC) in GPR119 WT and KO hepatocytes. Significant versus WT hepatocytes, ** $p < 0.01$ ($n = 3$).

(B) T0901317 (T090)-induced pSREBP-1 expression in GPR119 WT and -KO hepatocytes. GPR119-WT and -KO hepatocytes were incubated with T0901317 (T090, LXR agonist) for 12 h and the total cell lysates were subjected to immunoblotting for pSREBP-1. Significant versus control in WT hepatocytes, ** $p < 0.01$; significant versus control in GPR119 KO hepatocytes, \$\$ $p < 0.01$; significant versus T090-treated group in WT hepatocytes, # $p < 0.05$ ($n = 3$).

3. GPR119 리간드의 지질 합성 억제 효과

GPR119의 간세포 내 지질 합성 조절에 대한 역할을 검증하기 위하여 비알코올성 지방간을 일으키는 신호로 잘 알려진 고당/고인슐린 노출에 따른 SREBP-1 및 FAS 발현 변화를 관찰하였다 (30). 인간 간세포주인 HepG2 및 마우스의 1차 배양 간세포에 고당/고인슐린을 노출시킨 상태에서, GPR119 리간드인 MBX를 농도 별로 처리하였다. 그 결과, 고당/고인슐린 노출에 의하여 증가된 SREBP-1 및 FAS의 발현이 MBX를 처리할 경우 억제됨을 확인하였다 (Fig. 3A). 또한 고당/고인슐린 노출에 의한 SREBP-1의 핵 내 이동 증가가 MBX를 처리할 경우 현저히 억제됨을 확인하였다 (Fig. 3B). 마우스의 1차 배양 간세포에서 고당/고인슐린 노출에 의하여 증가된 지질 생성도 MBX 처리에 의하여 억제됨을 확인하였다 (Fig. 3C). 다음으로 SREBP-1의 반응성을 살펴보기 위하여 SREBP-1 활성화 신호로 잘 알려진 LXR 리간드인 T090을 이용하였다. HepG2 및 마우스의 1차 배양 간세포에서 T090에 의하여 유도되는 SREBP-1의 발현 및 지질 합성 효소인 ACC 및 SCD-1의 mRNA의 발현이 GPR119 리간드 두 종 MBX 및 GSK를 처리할 경우 농도의존적으로 억제함을 확인하였다 (Fig. 3D). 이러한 정상 마우스의 간세포에서 관찰되는 MBX 리간드의 SREBP-1 활성 억제 효과는 GPR119 결손형 마우스의 간세포에서는 나타나지 않았다 (Fig. 3E).

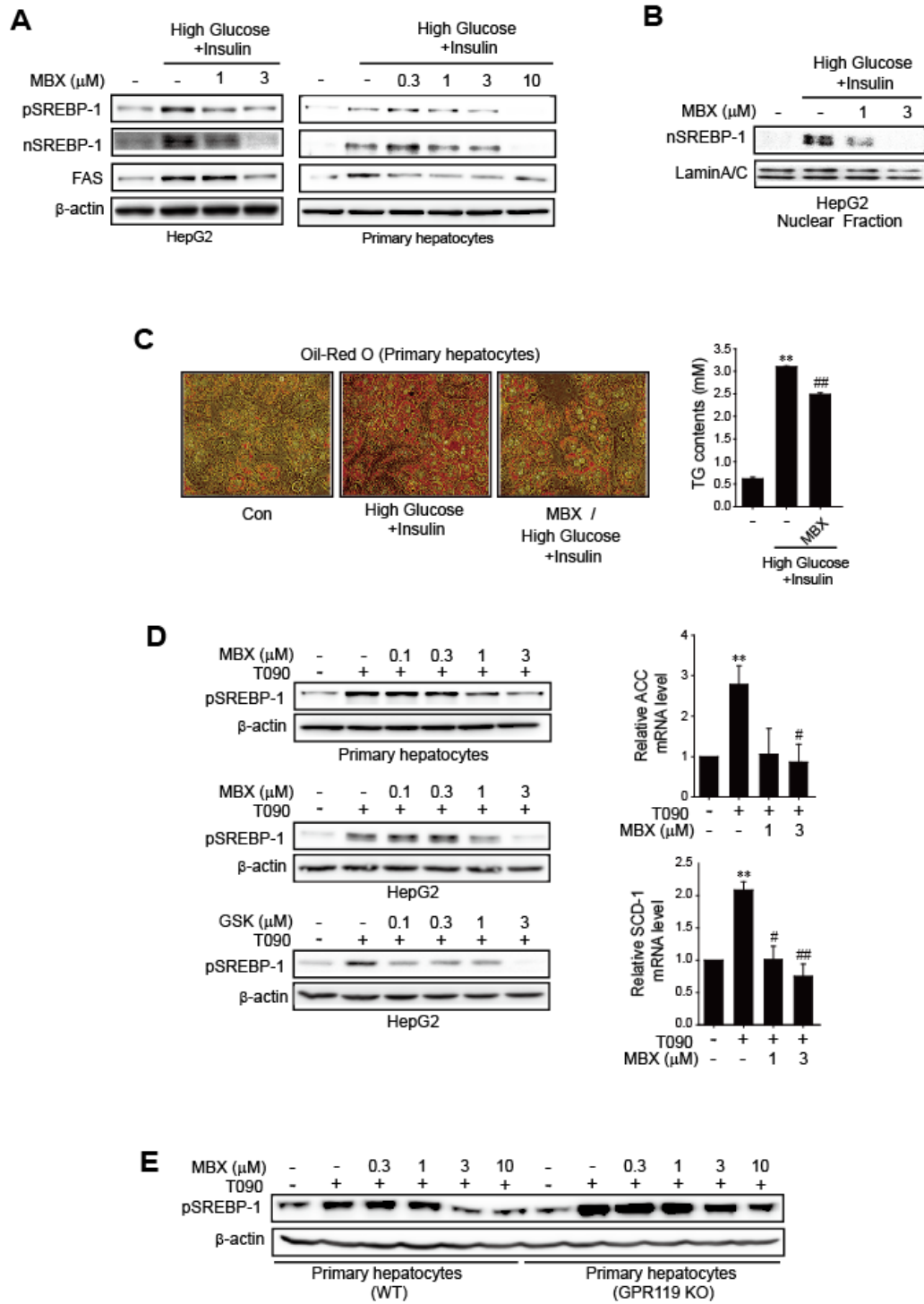


Fig. 3. Role of GPR119 in sterol response element binding protein (SREBP)-1-mediated hepatic lipogenic gene expression.

(A, B and C) Primary cultured hepatocytes and HepG2 cells were incubated in 30 mM high glucose (HG) medium for 30 min and further incubated with 200 nM insulin (Ins) for 24 h.

(A) Immunoblot analyses of pSREBP-1, nSREBP-1 and FAS.

(B) Immunoblot analysis of SREBP-1 in nuclear fraction.

(C) Oil red O staining. Original magnification, $\times 200$. Significant versus control, $**p < 0.01$; significant versus HG/Ins-treated group, $##p < 0.01$ (n=3)

(D and E) Effects of GPR119 ligands on T090-induced pSREBP-1 and lipogenic enzymes expression. Primary cultured hepatocytes from GPR119-WT and -KO mice and HepG2 cells were pretreated with two GPR119 ligands [(MBX or GSK (GSK1292263)] for 30 min and the cells were exposed to T090 for 12 h.

(D) Immunoblot analyses of pSREBP-1 and mRNA levels of lipogenic enzymes in HepG2 cells. Significant versus control, $**p < 0.01$; significant versus T090-treated group, $\#p < 0.01$, $\#p < 0.05$ (n=3).

(E) Immunoblot analyses of pSREBP-1 in GPR119-WT and -KO hepatocytes.

4. GPR119 리간드의 지방간 억제 효과

GPR119 리간드가 지방간 생성을 실제로 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 GPR119 야생형 마우스와 GPR119 결손형 마우스를 이용한 고지방식이 유도 지방간 모델에서 GPR119 리간드의 항 지방간 효과를 관찰하였다 (31). 6주간 고지방식이를 투여하고, 6주간의 추가 고지방식이 조건에서 10 mg/kg 용량으로 GPR119 리간드 2종 MBX와 GSK를 1일 1회 매주 5일 경구로 투여하였다. 간 조직을 적출한 후 H&E 및 Oil red O 염색을 진행하여 지질 축적 정도를 관찰하였다. 그 결과, 고지방식이에 의하여 유도된 간 내 지질 축적이 GPR119 리간드 투여 시 현저히 개선됨을 확인하였다. 하지만 GPR119 결손형 마우스에서는 GPR119 리간드 처리에 의한 효과는 나타나지 않았다 (Fig. 4A). 고지방식이군에서 증가된 간 무게, 간 내 중성 지질 함량, 혈중 콜레스테롤, 혈당 및 ALT 수치가 GPR119 리간드 투여 군에서 통계학적으로 유의성 있게 개선됨을 확인하였으며, GPR119 결손형 마우스에서는 GPR119 리간드 투여에 의한 효과는 나타나지 않았다 (Figure 4B and Table 1). 고지방식이에 의한 지방간 유도 모델의 간 조직 내 SREBP-1 및 지질 합성 효소인 FAS와 SCD-1의 발현을 관찰하였다. GPR119 리간드를 투여한 군에서 고지방식이군에 비하여 SREBP-1 및 FAS의 단백질 및 FAS와 SCD-1의 mRNA 발현이 억제됨을 확인하였다. 하지만 GPR119 결손형 마우스에서는 GPR119 리간드 처리에 의한 효과는 나타나지 않았다 (Fig. 4C). 이러한 결과는 GPR119의 활성화가 비알코올성 지방간

치료에 효능이 있음을 제시한다.

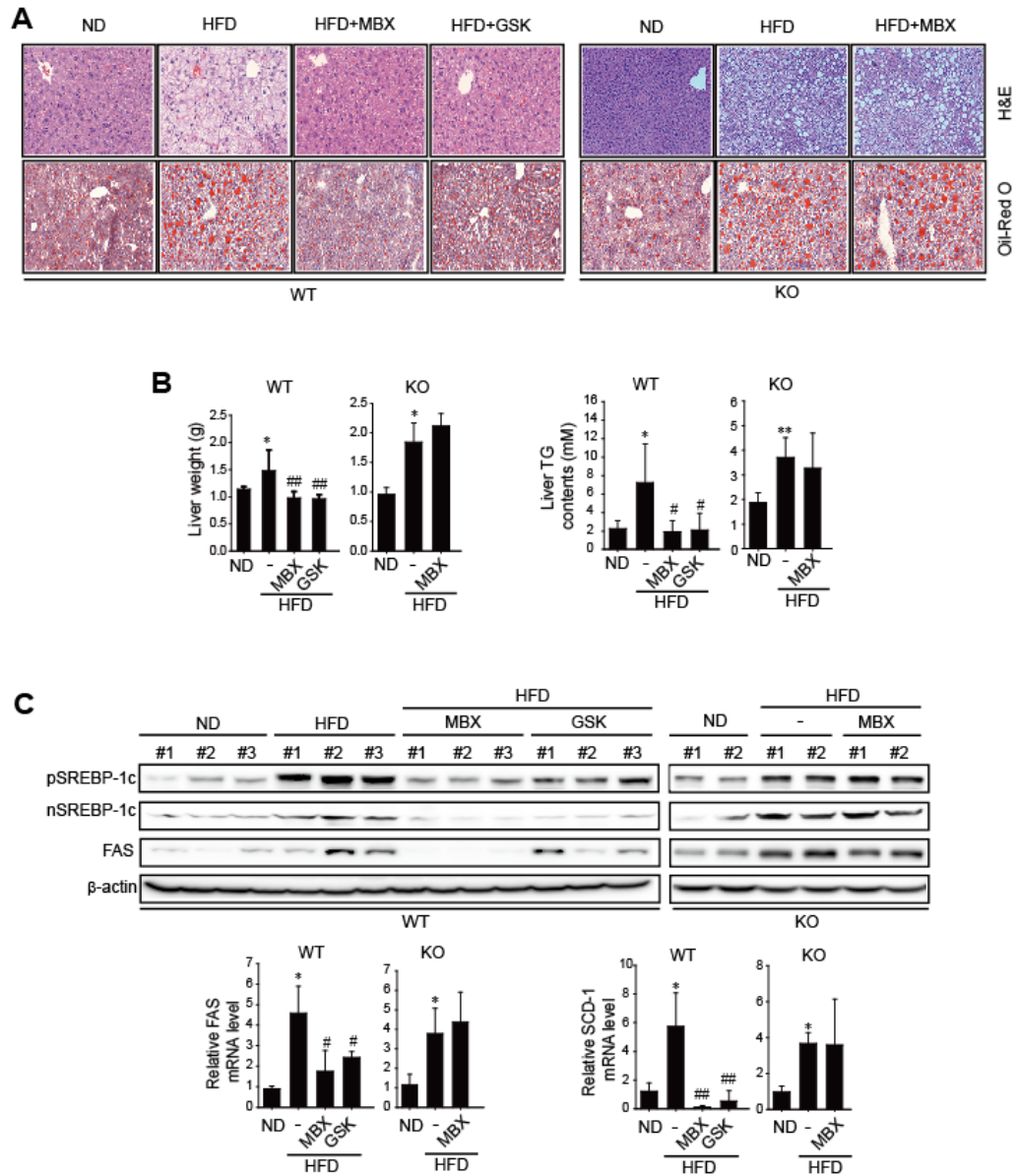


Fig. 4. Effects of GPR119 ligands on hepatic lipid accumulation in mice fed with high fat diet (HFD).

GPR119-WT and -KO mice were fed with normal (ND; n=5) or high fat diet (HFD; n=5) for 12 weeks. GPR119 ligand (MBX and GSK, 10 mg/kg/day) were orally administered to the mice for 5 times per week during the last 6 weeks of the diet feeding period.

(A) Liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Oil-Red O staining. Original magnification, $\times 200$ for H&E and Oil-Red O.

(B) Liver weight and hepatic TG contents in GPR119-WT and -KO mice.

(C) Effects of MBX and GSK on the hepatic expression of SREBP-1 and lipogenic enzymes in GPR119 WT and KO mice. Protein levels of pSREBP-1 and nSREBP-1. mRNA levels of FAS and SCD-1.

Significant versus control, * $p < 0.05$; significant versus HFD-fed group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (n=5).

Table 1. Effects of MBX on serum levels of ALT, glucose, total cholesterol and total triglyceride in GPR119-WT and -KO mice.

Treatment	WT			KO		
	ND	HFD	MBX	ND	HFD	MBX
ALT (U/L)	31±4.5	67±13.9**	25±4.3##	25±2.5	139±82.8**	189±60.1
Glucose (mg/dl)	60±7.6	142±32*	71±18.9#	96±29.4	285±95.6*	240±41.6
Total cholesterol (mg/dl)	131±5.7	203±21.9**	152±16.2##	121±26.3	204±25.7**	215±34.4
Total triglyceride (mg/dl)	122±11.7	133±16.8	100±22.3	127.5±1.9	133±23.5	130±16.8

ALT, alanine transaminase; ND, Normal diet; HFD, high fat diet.

Values are expressed as means±SD. *p<0.05, **p<0.01, compared with ND (control);

#p<0.05, ##p<0.01 (n=5), compared with HFD-fed group

5. GPR119 리간드의 AMPK 활성화를 통한 지질 합성 억제 효과

SREBP-1은 AMP-activated protein kinase (AMPK)활성화에 의하여 전사적 활성이 억제됨이 알려져 있다 (31, 32). 또한 SREBP-1은 AMPK에 의하여 세린(serine) 372번 잔기(Ser-372)에 인산화가 일어남으로써 불활성형으로 변화됨이 보고된 바 있다 (30). GPR119 리간드가 AMPK 활성화 작용과 SREBP-1c 세린(serine) 372번 잔기의 인산화에 미치는 영향을 규명하고자 마우스의 1차 배양 간세포 및 HepG2 세포주에서 AMPK 활성을 관찰하였다. MBX 및 GSK를 시간 의존적으로 처리하였을 때, 두 종의 GPR119 리간드 모두 AMPK를 강력하게 활성화시키고 (Fig. 5A) 이때 SREBP-1c의 세린(serine) 372번 잔기의 인산화도 증가됨을 확인하였다 (Fig. 5B). 나아가, AMPK의 저해제인 compound C 및 dominant negative (DN)-AMPK 도입 시 GPR119 리간드에 의한 SREBP-1 발현 억제가 회복됨을 확인하였다 (Fig. 5D). 하지만 GPR119 리간드에 의한 기존 GPR119의 2차 신호계로 알려진 cyclic AMP/protein kinase A (cAMP/PKA) 활성화는 관찰되었으나 PKA 저해제인 H-89을 처리하였을 때, SREBP-1에 미치는 GPR119 리간드의 억제 작용은 영향 받지 않았다 (Fig. 5C and 5D). 이는 GPR119 리간드에 의하여 활성화된 AMPK가 간세포 내 지질 축적 과정에서 증가되는 SREBP-1 발현 감소 및 SREBP-1c의 인산화를 통하여 지질 합성 효소의 유도 억제에 기여함을 시사한다.

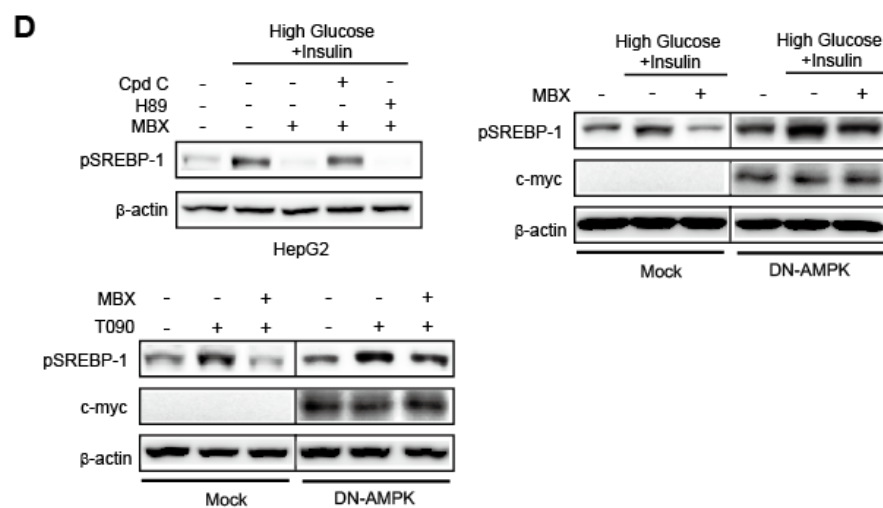
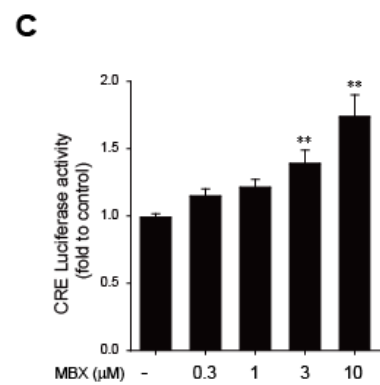
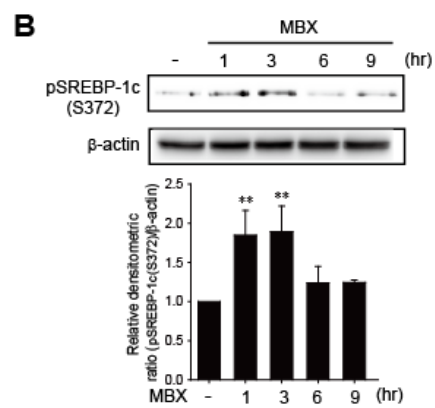
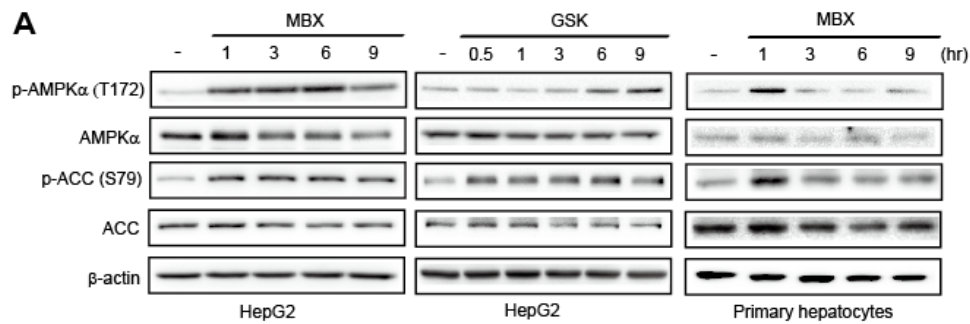


Fig. 5. Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in GPR119-dependent SREBP-1 down-regulation.

(A) Thr-172 phosphorylation of AMPK α and Ser-79 phosphorylation of ACC by GPR119 ligands in primary cultured hepatocytes and HepG2 cells. Primary cultured hepatocytes and HepG2 cells were treated with 3 μ M MBX and GSK, and Thr-172 phosphorylation of AMPK α and Ser-79 phosphorylation of ACC were determined in a time-dependent manner. Data were confirmed by repeated experiments.

(B) Stimulation of Ser-372 phosphorylation of SREBP-1c by MBX. HepG2 cells were treated with 3 μ M MBX and Ser-372 phosphorylation of SREBP-1c was determined.

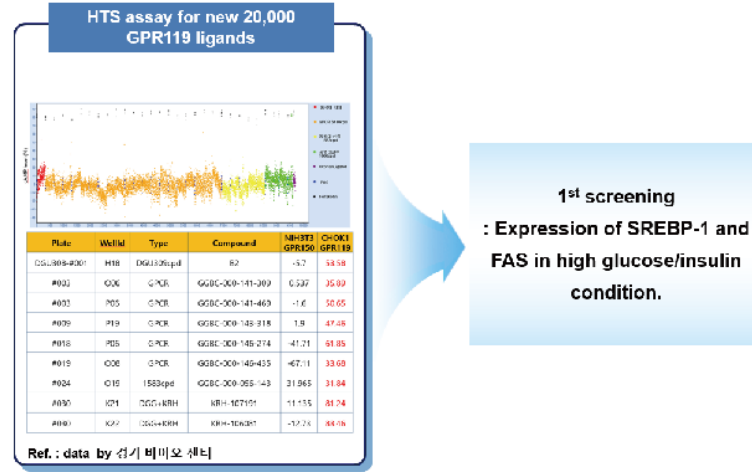
(C) cAMP response element (CRE) activity was assessed by transfection of CRE-minimal reporter in HepG2 cells.

(D) Reversal of MBX-mediated pSREBP-1 down-regulation by AMPK inhibition. HepG2 cells were pre-incubated with 10 μ M compound C (AMPK inhibitor) or 10 μ M H-89 (Protein kinase A inhibitor) and the cells were incubated in 30 mM high glucose (HG) medium for 30 min and further incubated with 200 nM insulin (Ins) for 24 h. HepG2 cells were pre-incubated with 10 μ M compound C (AMPK inhibitor) or 10 μ M H-89 (Protein kinase A inhibitor) and the cells were incubated in 30 mM high glucose (HG) medium for 30 min and further incubated with 200 nM insulin (Ins) for 24 h following Mock and DN-AMPK transfection. HepG2 cells were pretreated with 3 μ M MBX for 30 min and the cells were exposed to T090 for 12 h following Mock and DN-AMPK transfection

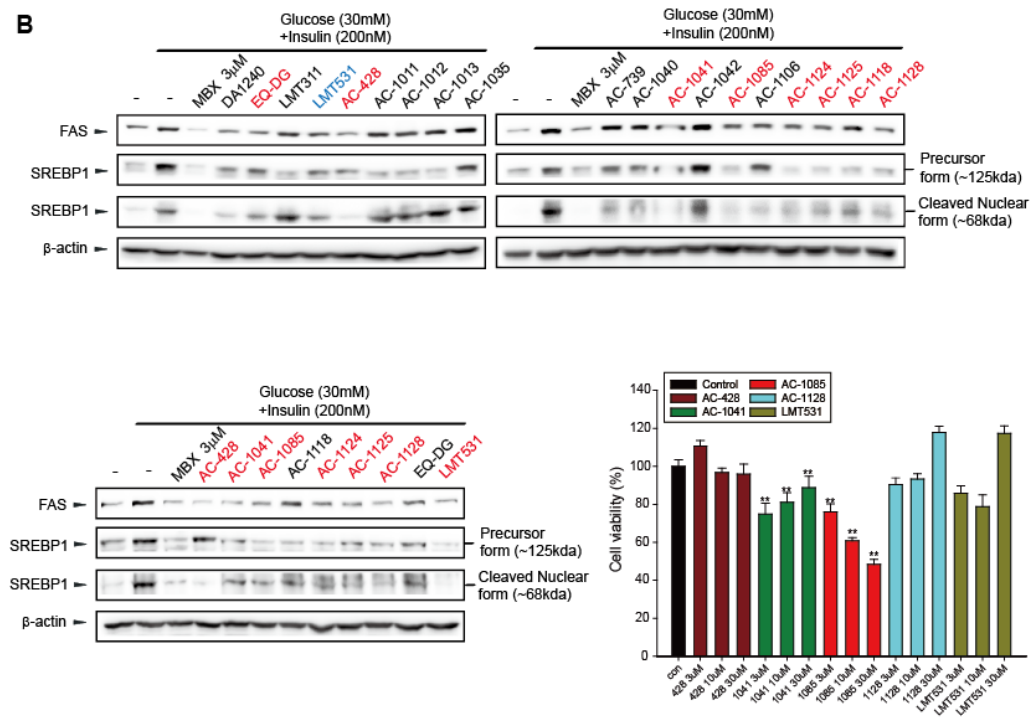
6. 신규 GPR119 리간드의 지질 합성 억제 효과

다음으로 신규 GPR119 리간드를 검색하는 세포기반 스크리닝법을 활용하여 비알코올성 지방간 치료제의 후보물질을 도출하고자 하였다. 경기 바이오 센터에서 수행한 세포 기반 스크리닝법으로 2만여종의 후보물질 중에서 도출된 hit 화합물들 중 약물개발 가능성이 있는 화학구조를 선별하였다 (Fig. 6A). 인간 간세포주인 HepG2에 고당/고인슐린을 노출시킨 상태에서, 이들 화합물들을 처리하여 증가하는 FAS 및 SREBP-1 발현을 동시에 억제하는 화합물들을 선별하였다 (Fig. 6B). 또한 선별된 화합물들 중 세포 독성 실험을 통하여 세포 독성을 일으키지 않는 물질을 도출하였다 (Fig. 6B). 세포독성이 관찰되지 않고 동시에 FAS 및 SREBP-1의 발현을 억제하는 약물 중 의약화학적으로 약물이 될 가능성이 높다고 판단되는 AC-428과 LMT-531을 선정하고 그에 대한 유도체 활성을 평가하였다. 인간 간세포주인 HepG2에 고당/고인슐린을 노출시킨 상태에서, LMT-531 유도체 및 AC-428 유도체들을 처리하였다. 그 결과, LMT-531 유도체들 중에서 LMT-587, LMT-588, LMT-467, LMT-575 물질과 AC-428 유도체들 중 KK11259, KK11260, KK11349 물질이 MBX와 유사한 활성을 보였다 (Fig. 6C and 6D). 상기 화합물 군은 신규 GPR119 리간드로 비알코올성 지방간 질환의 치료에 적용될 수 있을 것이다.

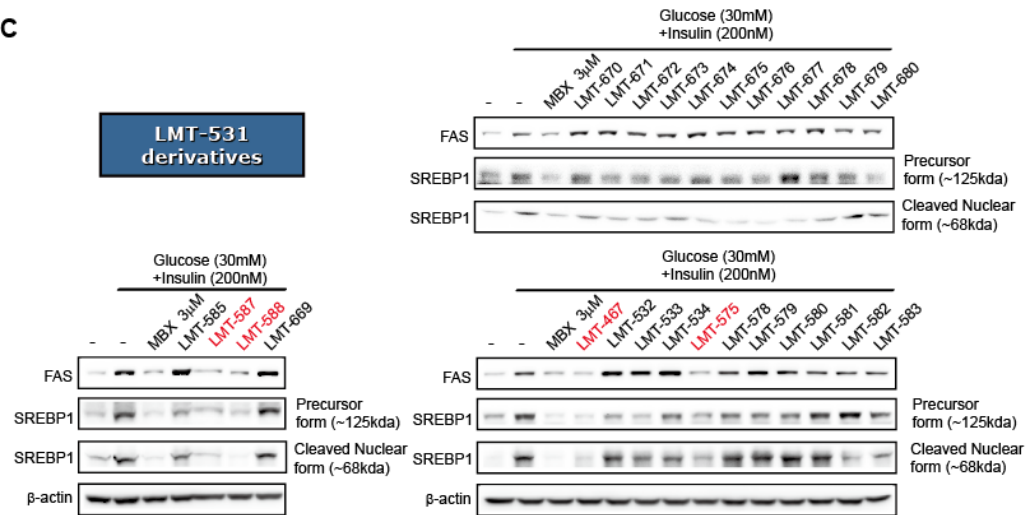
A



B



C



D

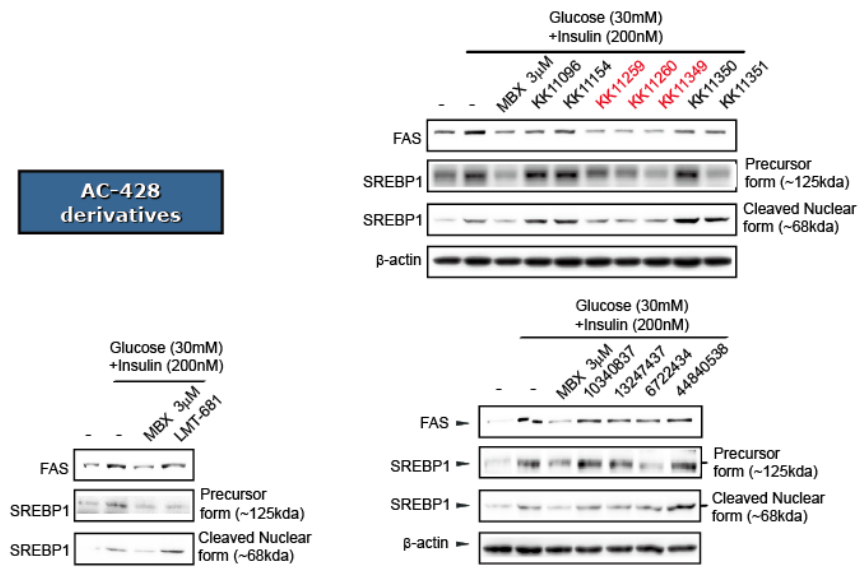


Fig. 6. Role of GPR119 analogues in SREBP-1-mediated lipogenic enzyme expression.

(A) HTS screening for GPR119 ligands to search for Hit compounds. HTS was performed by Kyunggi-Biotech.

(B, C and D) HepG2 cells were incubated in 30 mM high glucose (HG) medium for 30 min and further incubated with 200 nM insulin (Ins) for 24 h. Immunoblot analyses of pSREBP-1, nSREBP-1 and FAS. Cytotoxicity evaluated by MTT assay after exposure of GPR119 analogues to HepG2 cells.

7. 간 정상세포에서 GPR119의 발현

자유지방산 및 지질 유도체들의 다양한 수용체가 간 내 존재하는 세포들에서 발현하고 있다는 점에 착안하여, 간 섬유화 유도 시 활성화되는 간 정상세포에서 GPR119 발현을 관찰하였다. Conventional PCR을 수행한 결과, 간 정상세포의 *in vitro* 배양에 의한 활성화 단계인 1, 3, 7일 날짜 별로 확인하였을 때 1일부터 GPR119의 mRNA 발현을 확인하였고, GPR119가 발현되어 있다고 보고된 인간 유방암 세포주 MCF7과 인간 간 정상세포주인 LX-2에서도 GPR119의 mRNA 발현을 확인하였다 (Fig. 7A). 인간 간암 조직에서 유래한 간 섬유화 조직에서 면역조직화학염색을 통하여 GPR119 발현을 관찰한 결과, GPR119가 섬유화 조직 내 간 정상세포에서 발현됨을 확인하였다 (Fig. 7B). 이러한 결과는 GPR119가 간세포 뿐만 아니라 비실질세포인 간 정상세포에서도 발현됨을 시사한다.

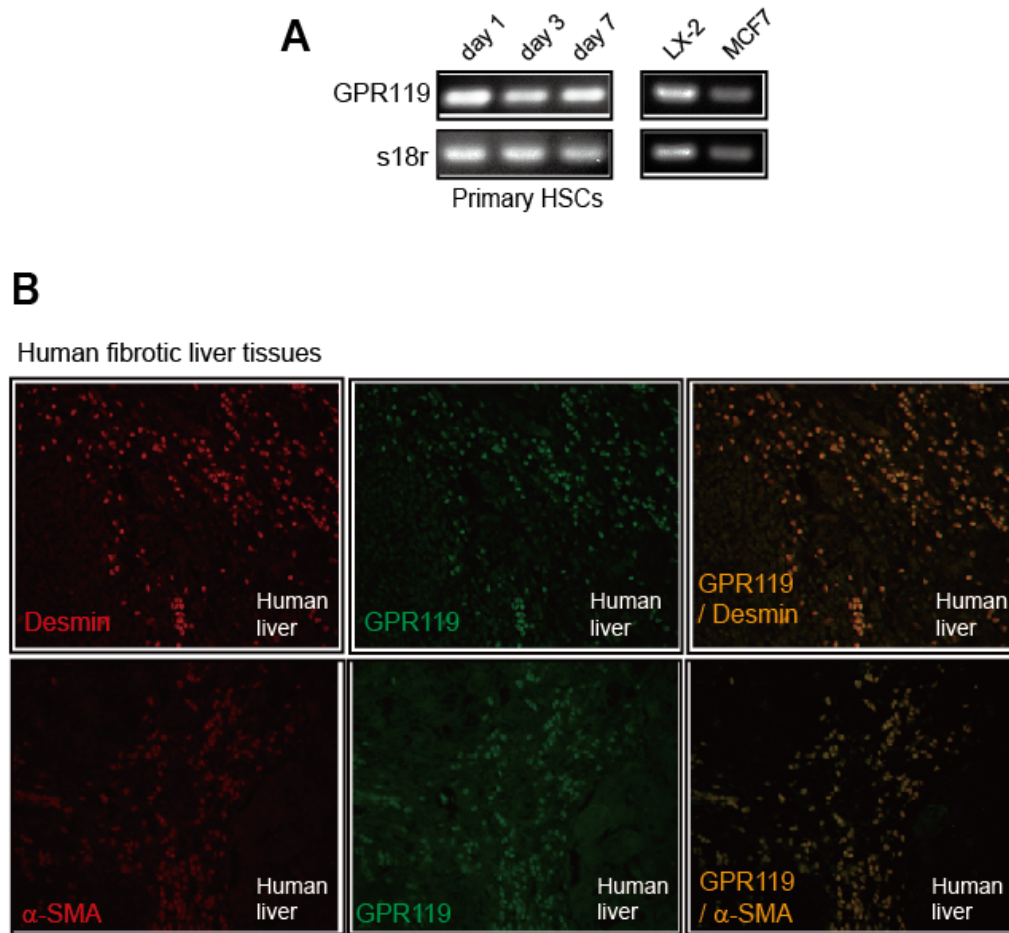


Fig. 7. Expression of GPR119 in hepatic stellate cells.

(A) mRNA levels of GPR119 during transition to the cultured activated phenotype (day 1, 3 and 7) in primary cultured hepatic stellate cells. mRNA levels of GPR119 in LX-2 and MCF7 cells.

(B) Immunofluorescence staining of GPR119 (x100). GPR119 expression in human fibrotic liver tissues.

8. GPR119 리간드의 간 정상세포 활성화 억제 효과

GPR119의 간 정상세포에서의 기능적 역할을 규명하고자 간 정상세포의 활성화에 대한 GPR119 리간드의 효과를 관찰하였다. 마우스 간에서 분리한 1차 배양 간 정상세포에 대하여 *in vitro* 배양에 의한 활성화 단계에서 유도되는 교원질 col1A1의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과, 간 정상세포를 *in vitro* 배양하고 동시에 MBX를 1일, 3일, 5일간 반복적으로 처리할 경우 교원질 col1A1 mRNA의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였다 (Fig. 8A). 또한 마우스 배아섬유모세포에서 기본적으로 발현되는 교원질 collagen I 및 활성화된 간 정상세포의 지표인 α -smooth muscle actin (α -SMA)의 단백질 발현이 MBX를 처리하였을 때 감소됨을 확인하였다 (Fig. 8B). 간 섬유화 유도에 영향을 미치는 주된 사이토카인(cytokine)인 TGF β 1은 간 정상세포의 강력한 섬유화 촉진 인자이다 (33). 따라서 인간 간세포주인 LX-2 세포에 TGF β 1을 처리하였을 때 증가하는 간 섬유화 유도 인자의 발현에 대하여 GPR119 리간드의 효과를 관찰하였다. TGF β 1 유도성 collagen I 및 TGF β 의 단백질과 mRNA 발현이 MBX를 처리하였을 때 감소함을 확인하였다 (Fig. 8C). 나아가 TGF β 1에 의하여 증가되는 섬유화 유도 신호 전달 경로인 Smad2/Smad3의 인산화 및 핵 내 이동이 GPR119 리간드 처리 시 억제됨을 확인하였다 (Fig. 8D). 이상의 결과는 간 정상세포에 존재하는 GPR119가 간 정상세포의 활성화 억제 및 TGF β 1 신호 전달 경로를 억제함으로써 간

섬유화 개선에 기여할 수 있음을 제시한다.

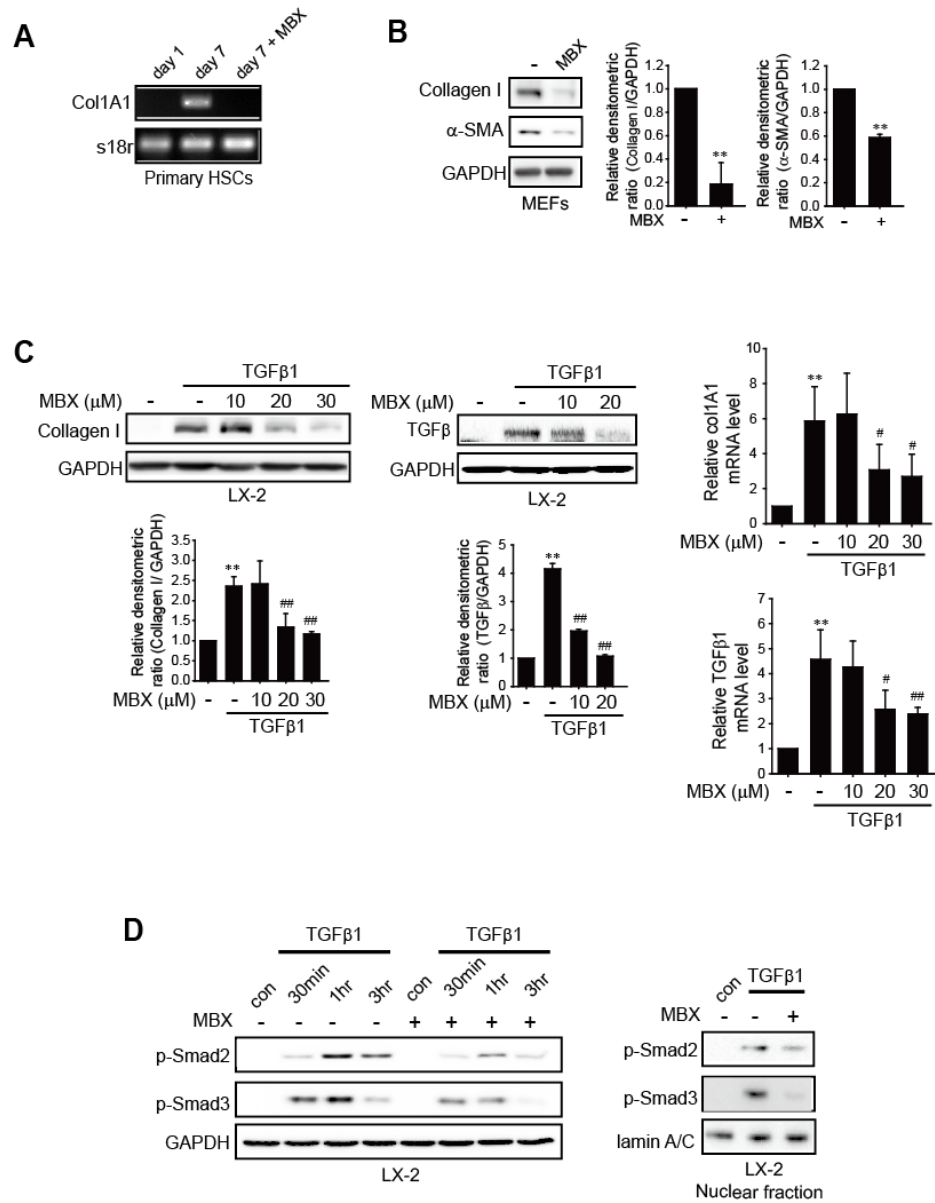


Fig. 8. Effects of GPR119 ligand on the activation of hepatic stellate cells.

(A) MBX inhibition of mRNA levels of *col1A1* during transition to the cultured activated phenotype (day 1, 3 and 7) in primary cultured hepatic stellate cells.

(B) Inhibition of collagen I and α -SMA expression by MBX in MEF cells. Significant versus control, $**p<0.01$ (n=3).

(C) LX-2 cells were treated with MBX for 1 h and further incubated with TGF β 1 treatment (2 ng/ml) for 24 h. Immunoblot analyses of collagen I and TGF β protein expression. Real-time PCR analysis of *col1A1* and TGF β 1 gene expression.

(D) MBX inhibition of TGF β 1-induced Smad2/Smad3 phosphorylation and nuclear translocation. Significant versus control, $**p<0.01$; significant versus TGF β 1-treated group, $##p<0.01$, $#p<0.05$ (n=3).

9. GPR119 리간드의 간 섬유화 억제 효과

GPR119 리간드가 간 섬유화를 개선 하는지 여부를 확인하기 위하여 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)에 의하여 유도되는 간 섬유화 동물 모델에서 GPR119 리간드의 간 섬유화 억제 효과를 관찰하였다. 사염화탄소 1 ml/kg를 주 2회 복강 내 투여하고 동시에 GPR119 리간드인 MBX를 20 및 40 mg/kg 용량으로 1일 1회 매주 5일간 경구 투여하였다. 3주 후 간 조직을 적출하여 collagen의 생성을 확인할 수 있는 Sirius red 염색 및 간 정상세포의 활성화 지표인 α -SMA 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 그 결과, 사염화탄소 투여에 의해 증가된 collagen 생성 및 α -SMA의 발현 증가가 GPR119 리간드를 40 mg/kg 투여한 군에서 감소함을 확인하였다 (Fig. 9A). Collagen의 주요 생체 분해 산물인 hydroxyproline을 정량하였을 때, 사염화탄소 투여에 의하여 증가된 hydroxyproline의 양이 GPR119 리간드를 40 mg/kg 투여한 군에서 통계학적으로 유의성 있게 감소함을 확인하였다 (Fig. 9B). 또한 사염화탄소 투여 군에서 증가된 혈중 ALT 수치가 GPR119 리간드 투여에 의하여 감소하였다 (Table 2). 또한 간 조직에서 사염화탄소 투여에 의한 섬유화 군에서 collagen I, TGF β 및 α -SMA의 단백질 발현 증가가 관찰되었다. GPR119 리간드 40 mg/kg를 투여한 군에서 collagen I, TGF β 및 α -SMA의 발현이 통계학적으로 유의성 있게 억제됨을 확인하였다 (Fig. 9C). 이러한 결과는 *in vitro* 상에서 관찰된 GPR119 리간드의 간 정상세포의 활성화 억제 효과와 일치하며, GPR119 리간드가 간 섬유화 치료에 효능이

있음을 제시한다.

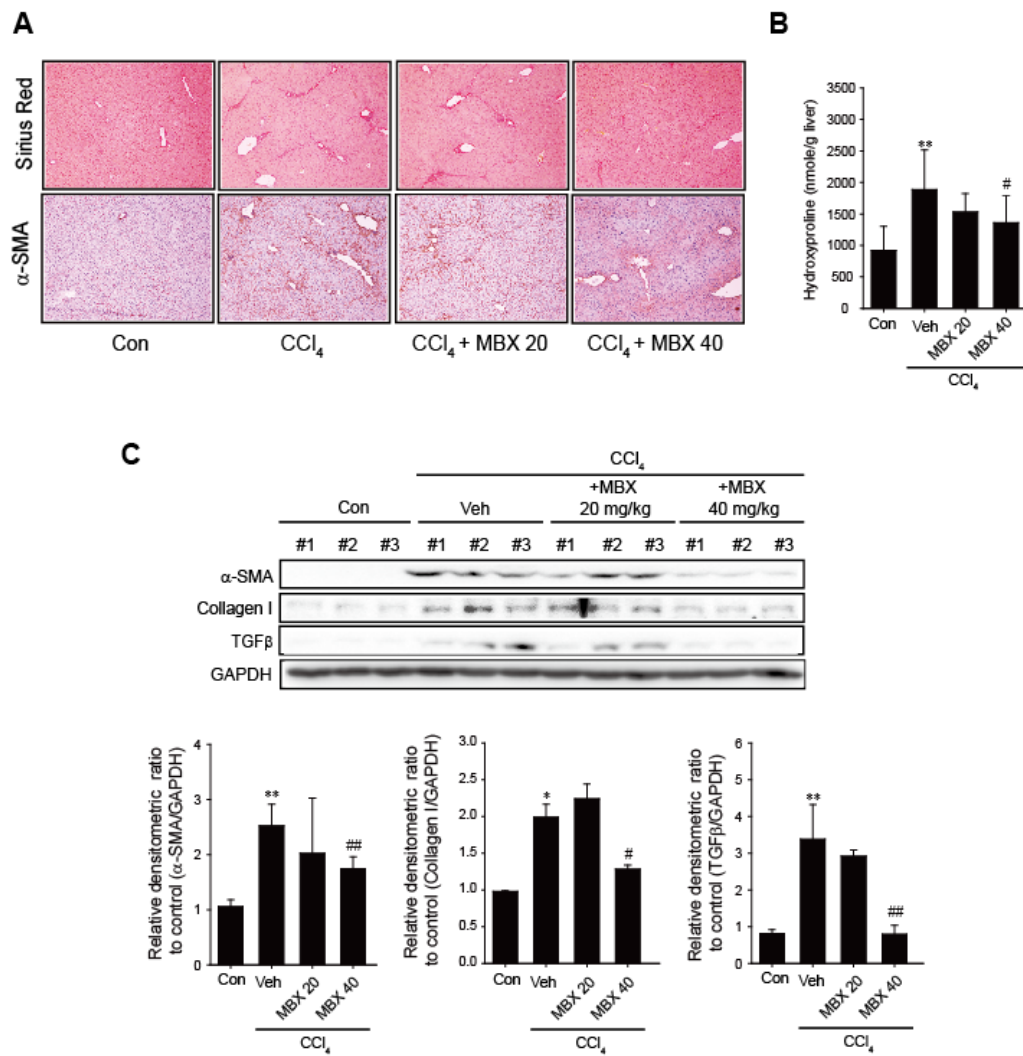


Fig. 9. Effects of GPR119 ligand on CCl₄-induced hepatic fibrosis mice model.

Hepatic fibrosis was induced by CCl₄ administered by intraperitoneal (i.p.) injection twice per week for 3 weeks. Control group mice were administered with olive oil as a vehicle.

GPR119 synthetic agonist (MBX, 20 and 40 mg/kg/day) and vehicle were orally administered to the mice for 5 times per week during CCl₄ treatment period.

(A) Representative images of Sirius red and α -SMA staining ($\times 100$).

(B) Quantification of hydroxyproline contents.

(C) Immunoblotting for α -SMA, collagen I and TGF β in liver tissues. Significant versus control, **p<0.01, *p<0.05; significant versus CCl₄-treated group, #p<0.05, ##p<0.01 (n=8).

Table 2. Effects of MBX on serum levels of ALT, AST, total bilirubin and direct bilirubin in CCl₄-induced fibrosis model.

Treatment	Veh	CCl ₄	CCl ₄ + MBX 20	CCl ₄ + MBX 40
ALT (U/L)	14.07±4.24	42.99±7.90**	38.55±9.43	32.06±5.17 [#]
AST (U/L)	56.67±15.85	93.25±38.08*	94.06±19.29	68.11±21.55
T-BIL (mg/dl)	0.15±0.02	0.23±0.07**	0.20±0.05	0.23±0.05
D-BIL (mg/dl)	0.06±0.01	0.15±0.05**	0.11±0.03	0.12±0.04

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; T-BIL, total bilirubin; D-BIL, direct bilirubin

Values are expressed as means±SD. *p<0.05, **p<0.01, compared with Veh (control);

[#]p<0.05 (n=8), compared with CCl₄-treated group

10. GPR119 리간드의 AMPK 활성화를 통한 간 섬유화 억제 효과

GPR119 리간드의 간 섬유화 억제 효과에 대한 신호체계를 규명하고자, GPR119 신호 전달 경로인 cAMP/PKA 활성화를 관찰하였다. GPR119 리간드에 의한 cAMP 활성화는 관찰되었으나, PKA 저해제인 H-89을 처리하였을 때 collagen I 및 TGF β 발현을 억제하는 GPR119 리간드의 작용을 상쇄하지는 못하였다 (Fig. 10A). AMPK 활성화는 간 정상세포의 분화 및 교원질 축적을 억제함이 보고된 바 있다 (34). 따라서 인간 간 정상세포주인 LX-2에서 GPR119 리간드의 AMPK 활성화 작용을 관찰하였다. MBX를 시간 의존적으로 처리할 경우 AMPK를 강력하게 활성화시킴을 확인하였다 (Fig. 10B). 나아가 AMPK 저해제인 compound C 처리 및 DN-AMPK를 형질 도입하였을 때 TGF β 1 유도성 간 섬유화 유도 인자(collagen I, TGF β)의 발현에 대한 GPR119 리간드의 억제 효과가 회복됨을 확인하였다 (Fig. 10C). 하지만 TGF β 1에 의하여 활성화되는 Smad3의 인산화에 대한 MBX의 억제 작용은 AMPK 억제에 의하여 부분적으로 회복되는 경향은 관찰하였으나 완전히 상쇄되지는 않았다 (Fig. 10D).

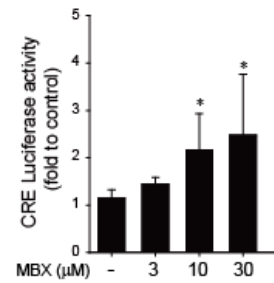
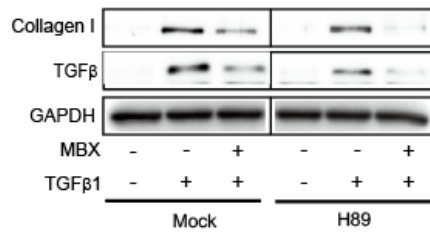
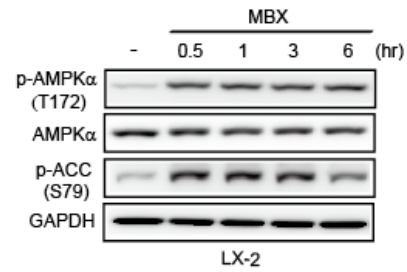
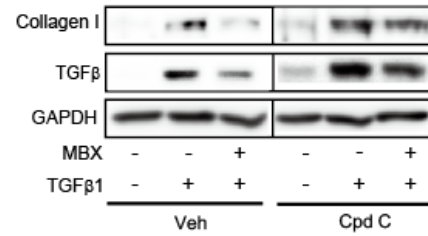
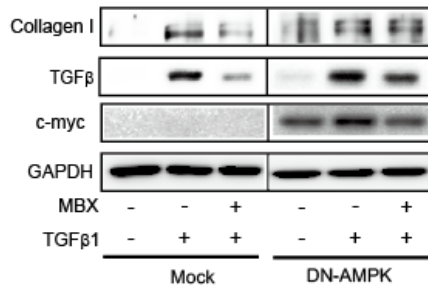
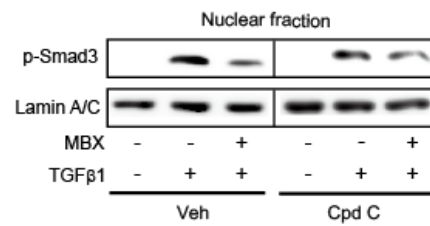
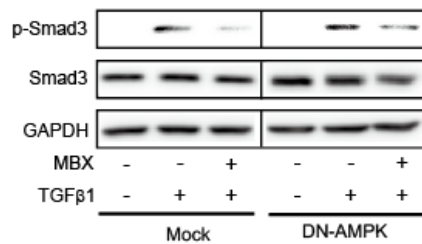
A**B****C****D**

Fig. 10. GPR119 ligand inhibition of TGF β 1-stimulated fibrogenic marker via AMPK activation.

(A) Above, activity of cAMP response element (CRE)-minimal reporter by MBX in LX-2 cells. Below, effect of PKA inhibition on MBX-mediated collagen I and TGF β down-regulation. Significant versus control, * $p < 0.05$ (n=6).

(B) Thr-172 phosphorylation of AMPK α and Ser-79 phosphorylation of ACC by MBX in LX-2 cells.

(C) Effect of AMPK inhibition on the repression of TGF β 1-stimulated collagen I and TGF β by MBX.

(D) Effect of AMPK inhibition on repression of TGF β 1-stimulated Smad3 activation by MBX.

기존 보고에 의하면, 정상세포에서 AMPK 활성화는 전사보조활성인자(transcriptional coactivator) p300의 프로테아좀 분해(proteasomal degradation) 증가를 통하여 Smad3와 p300의 상호작용을 저해하고 간 섬유화 유도 인자 발현을 억제시킨다 (34). 따라서 GPR119 리간드가 Smad2/ Smad3와 p300간의 상호 작용에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 인간 간 정상세포주인 LX-2에 GPR119 리간드를 처리하였을 때, TGF β 1에 의하여 증가된 Smad3와 p300간의 상호작용 및 Smad3의 아세틸화(acetylation)가 현저히 억제됨을 확인하였다 (Fig. 11A). 또한 ChIP-qPCR assay 수행 시 TGF β 1 처리 시 col1A1 유전자의 프로모터와 p300의 결합이 GPR119 리간드 처리에 의해서 억제됨을 확인하였다 (Fig. 11B). 다음으로 AMPK 활성화를 통한 Smad-p300간의 상호작용 억제에 대한 기전을 밝히고자 하였다. LX-2 세포에 GPR119 리간드를 단독으로 처리할 경우 활성화된 AMPK가 p300과 직접 결합함을 확인하였고, 이는 AMPK의 활성화가 p300과 Smad간의 상호작용에 영향을 미칠 가능성을 제시한다 (Fig. 11C). 다음으로 GPR119 리간드의 p300의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. LX-2 세포에 GPR119 리간드를 단독 처리하였을 때 p300의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하였으나 p300의 mRNA의 발현에는 영향이 없었다 (Fig. 11D). 따라서 GPR119 리간드에 의한 p300의 단백질 발현 감소가 프로테아좀 분해에 의하여 일어날 수 있음을 가정하고, 프로테아좀 저해제인 MG132를 사용하여 p300의 단백질 발현을 관찰하였다. 그 결과, GPR119 리간드 처리에

의하여 감소되는 p300의 단백질 발현이 MG132 처리 시 회복됨을 확인하였다 (Fig. 11D). 상기 결과는 간 정상세포에서 GPR119 리간드에 의하여 활성화된 AMPK가 p300의 프로테아좀 분해 증가를 일으키고, 이는 Smad-p300 간의 상호작용을 제어함으로써 TGF β 1에 의한 간 섬유화 유도 인자의 발현이 억제됨을 제시한다.

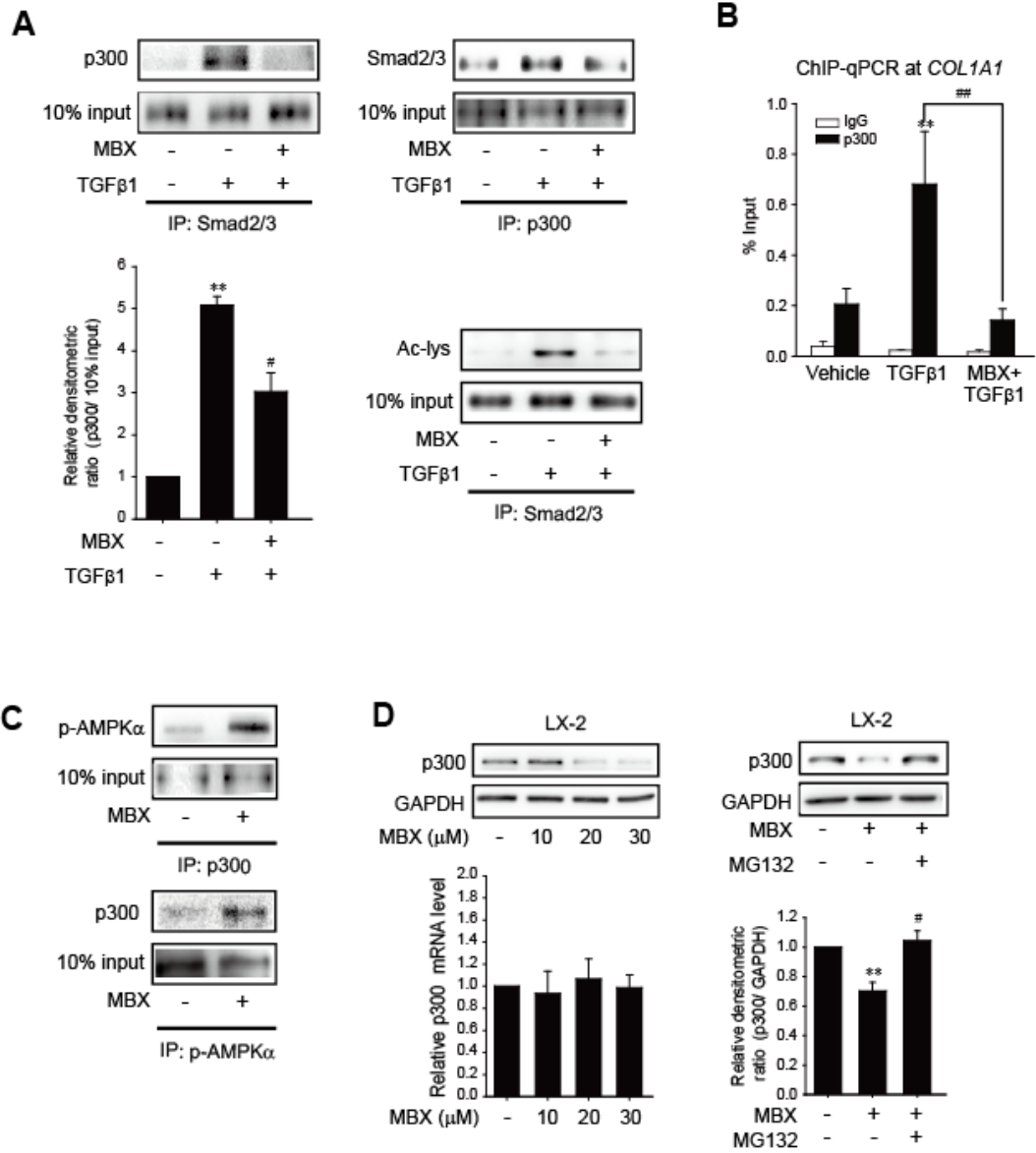


Fig. 11. Effects of GPR119 ligand on TGF β 1-induced Smad association with p300 and Smad3 acetylation.

(A) MBX inhibition of TGF β 1-induced the interaction between p300 and Smad2/3 and Smad3 acetylation. Significant versus control, **p<0.01; significant versus TGF β 1-treated group, #p<0.05 (n=3).

(B) ChIP-qPCR analysis. MBX inhibition of TGF β 1-stimulated coll1A1 regulatory region bound by p300. Significant versus control, **p<0.01; significant versus TGF β 1-treated group, ##p<0.01 (n=3).

(C) MBX promotion in the interaction of p300 with AMPK.

(D) MBX induction of p300 protein degradation through a proteasome-dependent pathway.

11. GPR119의 간 정상세포 증식 억제

간 섬유화 과정에서 관찰되는 간 정상세포 증식(proliferation)에 대한 GPR119 리간드의 효과를 평가하고자 하였다. 간 정상세포의 강력한 증식인자로 알려진 platelet derived growth factor (PDGF)를 도입하여 간 정상세포의 증식을 유도하고 그에 대한 GPR119의 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과, 간 정상세포주인 LX-2에서 GPR119 리간드를 처리할 경우 PDGF로 유도한 간 정상세포의 증식이 억제되었다 (Fig. 12A). 기존 보고에 따르면 PDGF에 의한 세포 증식에 관여하는 핵심 인자로서 peptidyl prolyl isomerase (Pin1)이 알려져 있다 (35). 따라서 GPR119 리간드 작용에 대한 Pin1의 관련성을 평가하고자 하였다. LX-2 세포에서 GPR119 리간드 MBX를 처리 시 Pin1의 발현이 시간 의존적으로 감소하였다 (Fig. 12B). 이는 GPR119의 간 정상세포의 증식 억제 효과가 Pin1 발현 조절을 매개하여 나타날 수 있는 가능성을 시사한다.

Pin1은 생성된 TGF β 1에 의하여 활성화되는 Smad2/3 단백질 안정화에 관여하고 TGF β 1 유도에 의한 전립선 암의 전이 및 침윤에 관여함이 보고되어 있다 (36). 따라서 간 정상세포주인 LX-2에 Pin1 adenovirus를 형질 도입하여 TGF β 1유도성 collagen I 및 TGF β 발현에 대한 GPR119 리간드의 억제 효과에 대하여 평가하였다. 그 결과, GPR119 리간드에 의한 collagen I 및 TGF β 발현 억제 효과가 Pin1을 과발현 시켰을 경우 반전됨을 확인하였다. 상기 결과는 GPR119 리간드가 간 정상세포 증식을 억제하고 세포 증식 인자인 Pin1 발현 조절을 매개로 하여 섬유화 유도 인자의 발현을 억제함을 시사한다.

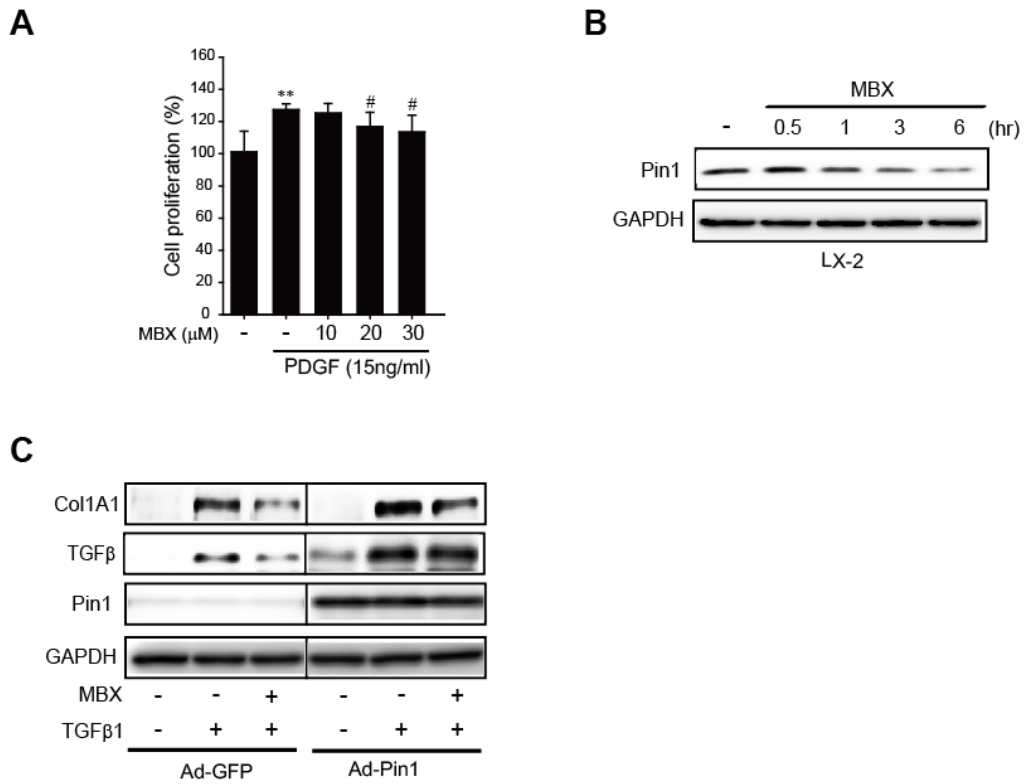


Fig. 12. Effect of GPR119 ligand on PDGF-induced proliferation, Pin1 expression and TGFβ1-stimulated fibrogenic marker via Pin1.

(A) Effect of MBX on PDGF-induced proliferation in LX-2 cells

(B) Effect of MBX on the expression of Pin1 in LX-2 cells.

(C) Effect of Pin1 over-expression on the repression of TGFβ1-stimulated collagen I and TGFβ by MBX.

12. Pin1에 의한 간 섬유화 조절

GPR119 리간드에 의하여 조절되는 Pin1은 세포 증식 조절 이외에 알러지성 폐 섬유화 과정에서 호산구의 TGF β 1 생성 및 하위 신호 전달 경로의 조절에 관여함이 보고되었다 (22). 하지만 간 섬유화에서의 Pin1의 병태생리적 역할은 보고된 바가 없다. 따라서 Pin1의 간 섬유화에 미치는 영향을 알아보하고자 간암 환자에서 획득한 정상 간 및 섬유화 조직에서 Pin1의 발현을 관찰하였다. 면역조직화학염색을 수행하여 관찰한 결과, 간 섬유화 조직 중 간 정상세포에서 Pin1의 발현이 현저히 증가되어 있음을 확인하였다 (Fig. 13A). 또한 dimethylnitrosamine (DMN)에 의하여 유도된 마우스의 간 섬유화 조직 내에서도 Pin1의 단백질 발현이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 13A). 이는 Pin1이 간 섬유화 과정 및 간 정상세포 활성화에 관여할 수 있음을 시사한다.

간 섬유화에서 교원질의 축적은 α -SMA의 발현을 특징으로 하는 간 정상세포의 근섬유모세포(myofibroblast)로의 분화 및 활성화에 기인한다 (8). 간 정상세포에서 Pin1의 기능적 역할을 알아보하고자 Pin1 adenovirus를 형질 도입한 인간 간 정상세포주 LX-2를 확립하여 α -SMA의 발현을 관찰하였다. 그 결과 Pin1 adenovirus를 형질 도입한 LX-2 세포에서 α -SMA 발현이 현저히 증가하였다 (Fig. 13B). 이와 반대로 Pin1 short hairpin RNA (shRNA)를 도입하여 Pin1 발현을 억제하였을 때, α -SMA의 발현이 감소하였고 Pin1 저해제인 juglone 처리 시 α -SMA 발현이 감소함을 확인하였다 (Fig. 13B). 이상의

결과는 간 섬유화 진행 시 Pin1의 발현이 증가하고, Pin1은 간 정상세포의 활성화 과정에 관여함을 지지한다.

TGF β 1은 활성화된 대식 세포 및 간 정상세포에서 분비되는 간 섬유화 핵심 인자로써 간 정상세포의 섬유화 유도인자 증가 및 그에 따른 세포 외 기질을 축적시키는데 관여한다 (37). 랫드의 간에서 분리한 1차 배양 간 정상세포에 Pin1 adenovirus를 형질 도입 시 TGF β 1 mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 13C). 또한 Pin1 adenovirus를 형질 도입한 LX-2 세포에서 TGF β 1 mRNA의 발현이 증가하였고 Pin1 결손형(knock out, KO) 마우스 배아 섬유모세포에서 그 발현이 현저히 감소되었다 (Fig. 13D). 나아가 Pin1 저해제인 juglone을 1차 배양 간 정상세포, LX-2 세포 및 마우스 배아 섬유모세포에 각각 처리하였을 때, TGF β 1 mRNA의 발현이 농도의존적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 13D).

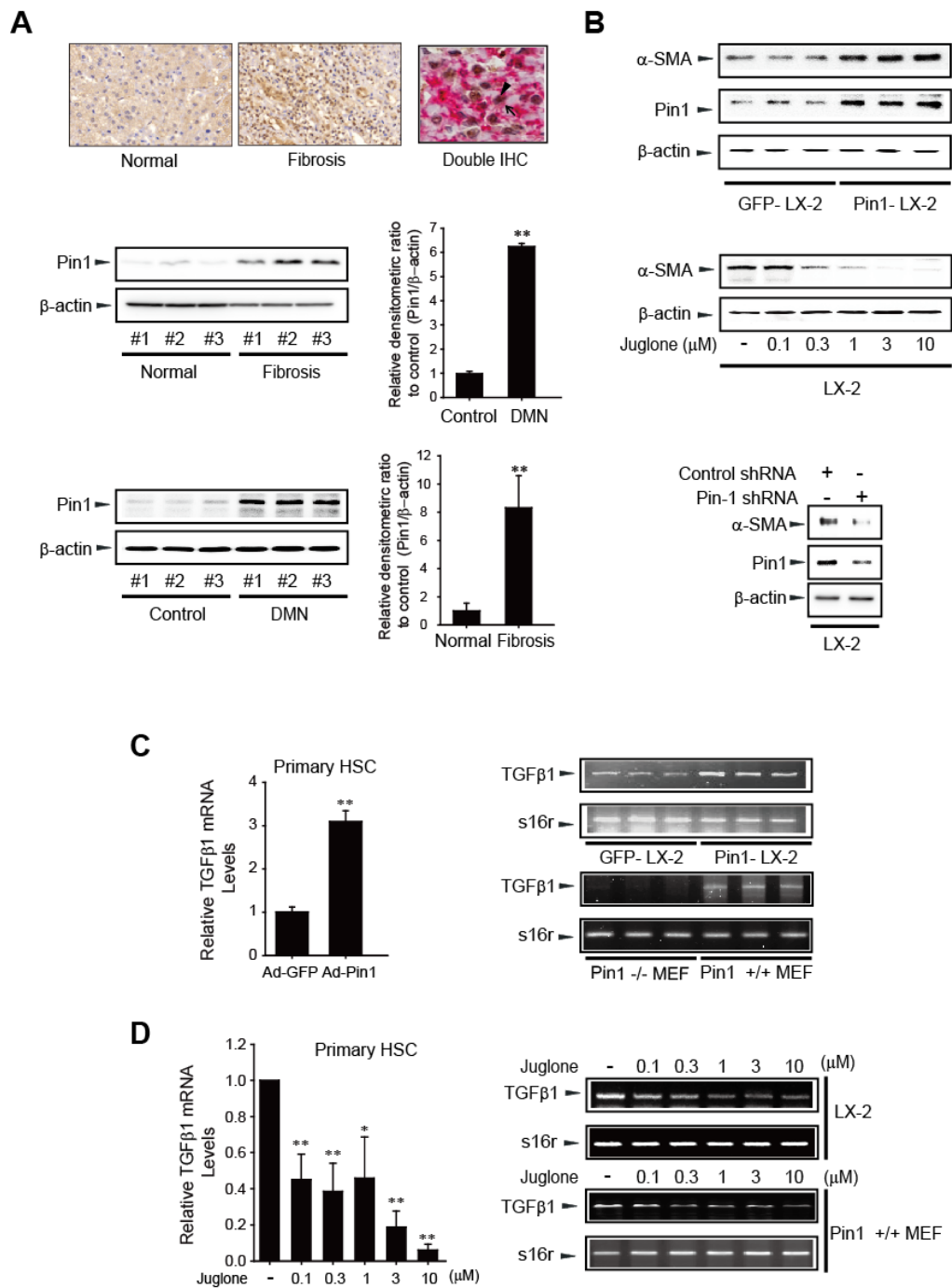


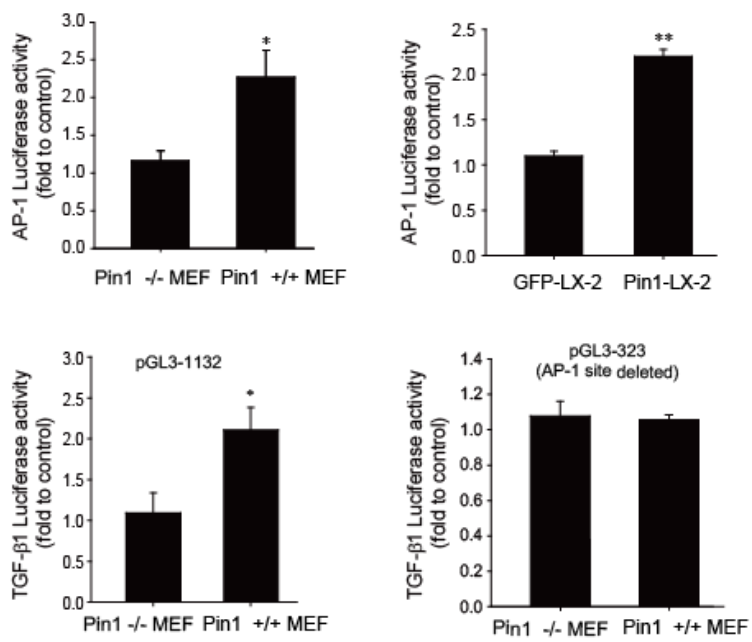
Fig. 13. Role of Pin1 in stellate cell activation and liver fibrosis.

- (A) Pin1 expression in human fibrotic liver. Pin1 immunohistochemistry. Cytoplasmic staining of α -SMA (arrow: red color); nuclear staining of Pin1 (arrow head: brown color). Significant versus normal, $**p<0.01$ (n=3). Pin1 expression in dimethylnitrosamine (DMN)-induced mouse fibrotic liver. Significant versus control, $**p<0.01$ (n=3).
- (B) α -SMA and Pin1 expression in Pin1-overexpressing LX-2 cells (n=3). Effects of Pin1 shRNA (left) and juglone (right) on α -SMA expression in LX-2 cells.
- (C) TGF β 1 mRNA expression in Pin1-LX-2, Pin1 $^{+/+}$ MEF and primary hepatic stellate cells. Significant versus Ad-GFP, $**p<0.01$ (n=3).
- (D) Effect of Pin1 inhibitor (juglone) on TGF β 1 mRNA expression in LX-2, Pin1 $^{+/+}$ MEF and primary hepatic stellate cells. Significant versus control, $*p<0.05$; $**p<0.01$ (n=3)

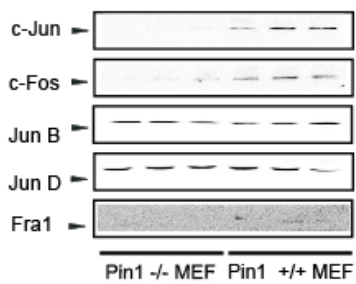
다음으로 Pin1에 의한 TGF β 1 유전자의 전사 조절을 규명하고자 하였다. TGF β 1 유전자의 전사 조절은 AP-1을 매개하여 조절됨이 보고되어 있다 (17). Pin1은 c-Jun/AP-1 또는 c-Fos/AP-1의 이성질화를 촉매하고, AP-1 의존적인 유전자 전사 활성을 조절하므로 Pin1의 AP-1 의존적인 TGF β 1 유전자 전사 조절의 가능성을 평가하고자 하였다. Pin1을 형질 도입한 LX-2 세포에서 AP-1 리포터 유전자 활성이 증가하였고, Pin1 결손형 마우스 배아 섬유모세포에서 그 활성이 감소하였다 (Fig. 14A). TGF β 1 프로모터에서 AP-1 결합부위의 역할을 규명하고자 AP-1을 포함하는 TGF β 1 프로모터 리포터 유전자 (pGL-1132) 및 AP-1 결합부위가 제거된 TGF β 1 프로모터 리포터 유전자 (pGL-323)를 이용하여 전사 활성을 평가하였다. 그 결과, Pin1 결손형 마우스 배아 섬유모세포에서 감소된 TGF β 1 프로모터 리포터 유전자 (pGL-1132) 활성이 AP-1 결합부위가 제거된 TGF β 1 프로모터 리포터 유전자 (pGL-323) 활성에서는 상쇄됨을 확인하였다 (Fig. 14A). 또한 Pin1 결손형 마우스 배아 섬유모세포에서 AP-1 구성 전사인자 패밀리에 c-Jun 및 c-Fos의 핵 내 이동이 Pin1 야생형(wild type, WT) 마우스 배아 섬유모세포와 비교하여 선택적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 14B). 다음으로 AP-1 전사인자 중 선택적으로 감소된 c-Jun과 c-Fos의 TGF β 1 유전자 발현 조절에 대한 역할을 규명하고자 하였다. LX-2 세포에 c-Jun과 c-Fos siRNA를 형질도입 하였을 때, c-Jun siRNA 도입에 의하여 선택적으로 TGF β 1 mRNA 발현이 감소하였다 (Fig. 14C). 이상의 결과는 Pin1이 c-Jun/AP-1 활성화에 따른 TGF β 1 유전자의 전사

조절에 관여함을 제시한다.

A



B



C

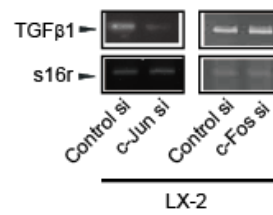


Fig. 14. Role of Pin1 in c-Jun/AP-1-dependent TGF β 1 expression.

(A) AP-1-dependent transcriptional activity in Pin1^{+/+} MEF and Pin1-LX-2 cells.

Significant versus Pin1^{-/-} MEF or GFP-LX-2 cells, *p<0.05; **p<0.01 (n=6). Promoter

deletion analysis of TGF β 1 promoter. Significant versus Pin1^{-/-} MEF cells, *p<0.05 (n=6).

(B) Nuclear levels of AP-1 components in MEF cells.

(C) Effects of c-Jun- or c-Fos-siRNA on TGF β 1 mRNA levels

13. Pin1의 TGFβ-Smad 신호전달 경로 조절

Pin1의 발현이 TGFβ1 수용체 하위의 Smad 신호 체계에 미치는 영향을 규명하고자 Smad binding element (SBE) 프로모터 리포터 유전자 활성을 평가하였다. Pin1 결손형 마우스 배아섬유모세포에서 SBE 프로모터 리포터 유전자 활성이 Pin1 야생형 마우스 배아섬유모세포에 비해 현저히 감소하였다 (Fig. 15A). 또한 인산화된 Smad2/Smad3의 기본 활성형이 Pin1 결손형 마우스 배아섬유모세포에서 감소하였다 (Fig. 15A). 또한 Pin1 결손형 마우스 배아섬유모세포 및 Pin1 저해제인 juglone을 처리한 1차 배양 간성상세포에서 TGFβ1 유도에 의한 Smad2/Smad3 인산화가 감소하였다 (Fig. 15B). TGFβ1에 의한 Smad 인산화 경로를 통하여 조절되는 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 발현을 관찰한 결과, Pin1 결손형 마우스 배아섬유모세포 및 Pin1 shRNA를 형질 도입한 LX-2 세포에서 기본형 및 TGFβ1 유도성 PAI-1 발현이 감소하였다 (Fig. 15C and 15D). 나아가 DMN에 의하여 유도된 간 섬유화 조직 중 PAI-1 발현 증가가 Pin1 저해제인 juglone 투약 군에서 감소함을 확인하였다 (Fig. 15D). 이는 Pin1이 TGFβ1-Smad 신호전달 체계에 핵심인자로 관여함을 시사한다.

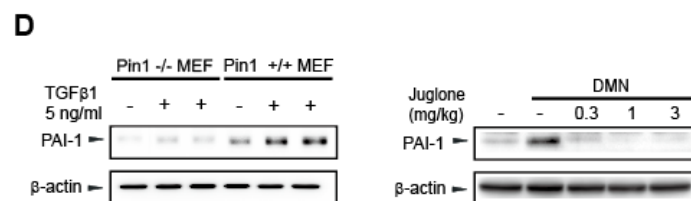
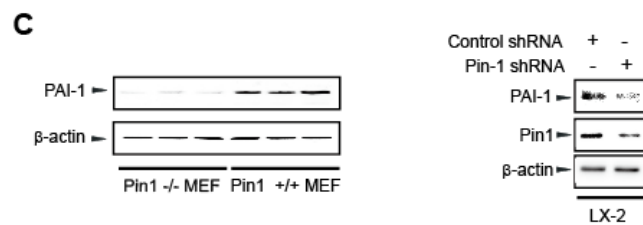
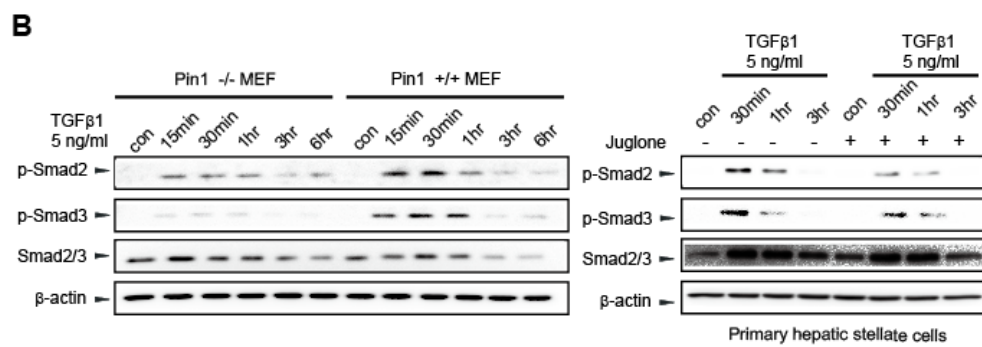
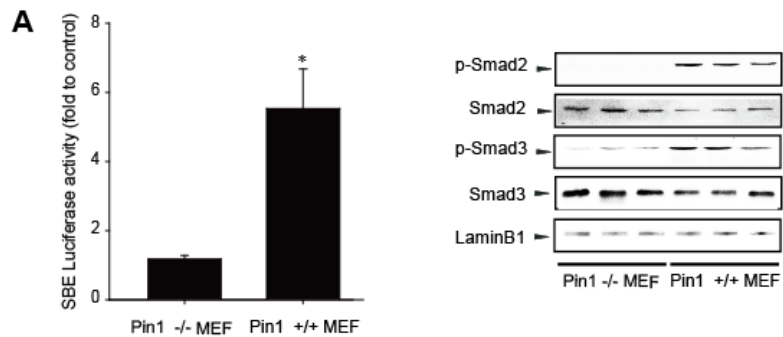


Fig. 15. Role of Pin1 in TGF β 1-dependent Smad2/3 activation and PAI-1 expression.

(A) Smad binding element (SBE) reporter activity and nuclear levels of phospho-Smad2/3 in MEF cells. Significant versus Pin1^{-/-} MEF cells, *p<0.05 (n=6).

(B) Amplification of TGF β 1-induced Smad2/3 phosphorylation in Pin1^{+/+} MEF, Pin1^{-/-} MEF and primary hepatic stellate cells.

(C) PAI-1 expression in Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} MEF cells (n=3). Effect of Pin1 shRNA on PAI-1 expression in LX-2 cells.

(D) TGF β 1-stimulated PAI-1 expression in Pin1^{+/+} and Pin1^{-/-} MEF cells. PAI-1 expression in the liver homogenates from mice treated with vehicle, DMN with or without juglone.

IV. 고 찰

GPR119는 당뇨병 치료제의 신규 타겟으로 GPR119 리간드인 MBX-2982가 임상 2상이 완료되어 있음이 보고되어 있다 (38). 기존 연구결과에서 GPR119의 간 내 발현이 거의 관찰되지 않았고, GPR119 결손형 마우스의 혈중 자유지방산과 중성지방 양이 정상 마우스에 비하여 높지 않다는 사실은 비알콜성 지방간에 대한 GPR119 리간드의 효능을 평가하지 않은 이유가 되었다 (39). 하지만 bonini 등의 특허에서 췌장에서 발현되는 GPR119의 발현과 비교하여 그 발현이 낮지만, 인간 및 마우스의 간 조직 내에서 GPR119가 mRNA 수준에서 발현되어 있음을 제시한 바 있다 (40). 본 연구에서 수행한 면역화학조직 염색 및 중합효소연쇄반응(PCR) 결과를 통하여 GPR119가 인간과 마우스의 간 조직 및 마우스의 간세포에서 발현되어 있음을 증명하였다.

인체 내 지질 대사는 지질의 합성, 산화 및 배출간의 평형 유지가 간에 의하여 엄격히 조절되고 있다 (41). 특히 간 내 인슐린 저항성(insulin resistance)은 비정상적인 지질 합성 조절과 밀접한 관련이 있다 (1). 본 연구의 새로운 발견은 GPR119 결손형 마우스의 간세포에서 지질 합성 효소인 FAS, ACC의 발현이 특이적으로 증가하는 것이다. 이는 GPR119가 간세포의 지질 합성(lipogenesis)에 영향을 미치고 있음을 시사한다.

SREBP-1은 지질 합성 효소, 지방산 흡수(uptake)와 관련된 유전자 발현을

조절하는 핵심 전사인자로서 SREBP-1이 과발현된 마우스는 중성지방의 비정상적인 축적을 나타낸다 (29, 42). 특히 간 내 SREBP-1은 제2형 당뇨병, 이상지질혈증 및 지방간 발병과 밀접한 관련이 있다 (43). 본 연구에서는 GPR119의 선택적 리간드인 두 약물(MBX2982, GSK1292263)이 마우스에서 1차 배양한 간세포 및 고지방식으로 유도한 지방간 동물모델에서 지질 생성을 효과적으로 억제함을 최초로 규명하였다. 또한 고지방 식으로 유도한 지방간 병리 모델에서 GPR119 리간드 투여는 간 내 지질 축적을 억제함과 동시에 지질 합성 효소의 발현을 감소시켰으며 이들 유전자 발현의 핵심 전사인자인 SREBP-1의 발현 역시 억제하였다. 이러한 GPR119 리간드의 지방간 감소 효과는 GPR119이 결손된 마우스에서 나타나지 않았다. 이는 GPR119의 활성화가 비알코올성 지방간 치료에 효능이 있음을 제시한다.

GPR119 리간드는 췌장의 베타세포 및 소장의 장내분비세포인 K-세포와 L-세포에서 GLP-1의 분비를 증가시켜 항당뇨 효과를 나타낸다 (12). 기존 보고에 따르면 GLP-1 analogue는 유전성 비만 마우스(*ob/ob* 마우스)의 간 및 간세포 내 지질 축적을 억제한다 (44, 45). 하지만 glucose에 의하여 분비되는 혈중 GLP-1은 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 효소에 의하여 수분 내로 빠르게 분해되는 반면 GLP-1 analogue는 DPP-4 효소에 대한 저항성이 있다 (46). 항 지방간 효과를 갖는 GLP-1 analogue의 용량(10~20 µg/kg)은 항 당뇨 효과를 갖는 GLP-1 analogue의 용량(2~3 µg/kg)에 비하여 매우 높은 편이다 (45, 47). 또한 항 당뇨 효과를 갖는 GLP-1의 혈중 농도(총 GLP-1 기준: 70~150

pmole/L)는 GPR119 리간드에 의하여 증가된 GLP-1 혈중 농도(총 GLP-1 기준: 20 pmole/L)와 비교 시 상대적으로 높은 농도에서 나타나는 효과임을 고려할 때 (48, 49), GPR119 리간드의 항 지방간 효과는 GLP-1 분비 효과에 의한 것은 아니라고 예측된다. GPR119 리간드의 지방간 억제 효과는 지방산 산화 및 배출을 증가시키는 복합적인 작용으로 나타날 가능성이 있다. 하지만 정상 마우스 및 GPR119가 결손된 마우스에서 혈중 중성지질의 농도를 측정하였을 때, GPR119 리간드 투여시 중성지질의 양은 변화가 없었다. 그리고 GPR119 활성화가 마우스의 1차 배양한 간세포 및 인간 간세포주에서 지질 축적을 직접적으로 억제한 결과로 보아 지방간에 대한 GPR119 리간드의 억제효과는 1차적으로 간세포 내 지질합성경로의 억제를 통해 일어나는 것으로 사료된다. 결론적으로 GPR119 및 그에 대한 활성화가 SREBP-1을 매개로 한 간 내 지질 합성 경로를 억제할 수 있는 새로운 타겟이 될 수 있음을 제시하였다.

LXR α 는 간세포에서 SREBP-1의 유전자 발현을 유도하고, 지질 항상성을 조절하는 중요 전사인자이다 (50). LXR α 의 대표적인 리간드인 T0901317 (T090)를 마우스에 투여하였을 때, SREBP-1 의존적인 지질 합성 효소의 발현과 혈중 및 간 내 중성지질 함량이 현저히 증가됨이 밝혀져 있다 (51). 본 연구에서 인간 간세포주에 GPR119 리간드 처리 시 LXR α 리간드(T090) 처리에 의하여 증가된 SREBP-1의 발현 및 지질 합성 효소의 발현이 억제됨을 확인하였다. 이는 GPR119 활성화가 LXR α 신호 전달 경로와

연결되어 있음을 시사한다. 정상 마우스의 간세포에서 관찰되는 MBX 리간드 3 μM 에서 나타나는 SREBP-1 발현 억제 효과는 GPR119가 결손된 간세포에서는 나타나지 않았다. 하지만 MBX 10 μM 처리시 SREBP-1 발현 억제 효과가 GPR119가 결손된 간세포에서 관찰되었다. 기존 보고에 따르면 GPR119의 내인적 리간드인 oleoylethanolamide는 peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) 리간드로 작용하여 체중감소효과를 가지고 있다 (12, 52). 이는 GPR119 리간드의 SREBP-1 발현 억제 효과가 GPR119를 경유한 신호 전달 경로 이외의 다른 신호 전달 경로도 부분적으로 관여할 가능성이 있는 것으로 판단된다.

AMPK는 생체 내 에너지 인식 및 항상성을 조절하는 주요 인자로서 지질 합성 및 분해 경로에 관여하여 간 내 지질대사를 조절하는 α 소단위($\alpha 1$, $\alpha 2$), β 소단위($\beta 1$, $\beta 2$)와 γ 소단위($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$)로 구성된 heterotrimeric 효소이다. AMPK는 α 소단위의 N-말단(N-terminal) 측쇄 부위 중 쓰레오닌(threonine) 172번 잔기(Thr-172)의 인산화에 의하여 활성화된다 (53). 활성화된 AMPK (Thr-172의 인산화)는 지질 합성 효소의 유전자 발현을 억제시키는데, 그 중 지질 합성에 중요한 전구체인 malonyl-CoA를 합성하는 ACC의 세린(serine) 79번 잔기(ser-79)를 인산화시켜 ACC를 불활성화시킨다 (54). 마우스에서 분리한 1차 배양 간세포 및 인간 간세포주에서 GPR119 리간드를 처리하였을 때, AMPK α 의 쓰레오닌 172번 잔기 및 ACC의 세린 79번 잔기가 인산화되었다. 대표적인 AMPK 활성화제인 metformin 과 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-

imidazole-4-carboxamide (AICAR)의 경우도 직접적으로 SREBP-1c 내 세린(serine) 372번 잔기(Ser-372)를 인산화시켜 SREBP-1을 불활성화 시킨다 (30). 본 연구에서 GPR119 리간드가 SREBP-1c 내 세린 372번 잔기를 인산화시키는 것을 밝혔으며, 이는 GPR119 리간드의 SREBP-1의 불활성화시키는 경로로서 제시될 수 있다.

GPR119는 $G\alpha$ stimulatory ($G\alpha_s$) 단백질을 경유한 cAMP를 증가시키고 PKA 신호 활성화 경로를 통하여 GLP-1 및 인슐린 분비를 촉진하는 작용을 나타낸다 (12). 본 연구에서 cAMP response element (CRE)의 리포터 분석을 통하여 GPR119 리간드 처리에 의해 cAMP/PKA 신호 경로가 활성화 되는 것을 확인하였다. 그러나 PKA 저해제인 H-89를 도입하였을 때 GPR119 리간드의 SREBP-1 억제 효과가 반전되지 않았고 AMPK의 억제제인 compound C 및 DN-AMPK 도입하였을 때 GPR119 리간드에 의한 SREBP-1 발현 억제가 회복되었다. 이는 기존에 알려진 GPR119 리간드의 cAMP 증가 작용에 의한 GLP-1 및 인슐린 분비와는 별개의 작용으로 GPR119 리간드가 AMPK 활성화를 통하여 지질 합성 신호 전달 경로를 억제하고, $G\alpha_s$ 단백질이나 다른 종류의 G 단백질을 경유하여 지질 합성 신호 전달 경로를 억제할 가능성이 있다. 결론적으로, 간세포 내에 발현하는 GPR119가 AMPK 신호 전달 경로를 매개로 한 SREBP-1의 불활성화를 통하여 지질 합성 경로를 억제한다는 것을 최초로 규명하였고, 비알코올성 지방간 치료를 위한 효과적인 약물 작용점이 될 수 있음을 제시하였다.

NAFLD의 마지막 단계인 간 섬유화는 무증상의 상처 치유과정이지만 지속적인 간세포의 손상 및 염증반응이 반복적으로 일어나게 되면 간경변증으로 발전되어 사망에 이르게 된다 (55). 이러한 간 섬유화 유도 과정에서 세포 외 기질을 생산하는 주 생산원인 간 성상세포(hepatic stellate cell)는 근섬유모세포(myofibroblast)로 분화 및 활성화되며 교원질을 포함하는 각종 세포 외 기질 생성 증가를 야기한다. 따라서 성상세포 활성화 및 관련 신호 전달 경로의 억제가 섬유화를 개선할 수 있는 약리 타겟으로 제시되고 있다 (8). 본 연구에서 인간 간 섬유화 조직 내 간 성상세포 및 마우스에서 분리한 1차 배양 간 성상세포에서 GPR119가 기본적으로 발현되어 있음을 최초로 규명하였다. 또한 성상세포가 활성화 되는 과정에서 유도되는 collagen I의 발현이 GPR119 리간드에 의하여 억제되었다. 나아가 사염화탄소로 유도한 간섬유화 병리 모델에서 GPR119 리간드는 간 조직 내 교원질인 collagen 침착 및 간 섬유화를 유도하는 강력한 사이토카인 TGFβ의 생성을 억제하였다. 또한 간 성상세포의 활성화 지표인 α-SMA의 발현이 억제되는 것을 관찰하여 GPR119 리간드가 간 성상세포의 활성화 과정을 억제시킨다는 것을 확인하였다. 따라서, GPR119 리간드는 간 섬유화의 개선 및 억제에 기여할 것으로 판단된다.

TGFβ는 간 성상세포의 강력한 섬유화 촉진 인자이며 간 성상세포 자체가 TGFβ의 주 생성원이다 (56). 또한 TGFβ는 성상세포에 존재하는 수용체 [(type II (TβRII) and type I (TβRI) receptor] 를 통하여 Smad2/Smad3 인산화 신호

전달 체계를 이용하여 섬유화 유도인자의 전사적 활성화를 유도한다 (56). 본 연구에서 TGFβ1에 의하여 증가되는 섬유화 유도 인자 발현이 GPR119 리간드에 의해 억제되었고, 나아가 TGFβ1에 의한 Smad2 및 Smad3의 인산화 및 핵 내 이동 증가가 GPR119 리간드에 의해 감소함을 밝혔다. 따라서, GPR119 활성화는 간 정상세포의 활성화 및 TGFβ 신호 전달 경로를 억제함으로써 섬유화 유도 인자의 발현 억제를 통하여 간 섬유화 개선에 기여하는 것으로 사료된다.

상기 제시된 GPR119에 의해 활성화되는 AMPK는 생체 내 에너지 항상성을 조절하는 인자로서 작용할 뿐만 아니라 간 섬유화 신호 전달 체계에도 관여함이 보고되어 있다 (57, 58). AMPK 활성화는 간 정상세포의 가장 강력한 증식인자인 PDGF에 의하여 유도되는 세포 증식(proliferation) 및 이동(migration)을 억제한다 (59). Adiponectin의 간 정상 세포에서 나타나는 항 섬유화 효과 또한 AMPK 활성화를 매개하여 나타난다 (58). 간 정상세포에서 GPR119 리간드는 AMPK를 강력하게 인산화시켰으며, TGFβ1에 의하여 증가하는 간 섬유화 유도 인자 발현에 대한 GPR119 리간드의 억제 효과가 AMPK 억제에 의하여 반전됨을 확인하였다. 그러나 GPR119의 잘 알려진 cAMP/PKA 신호 전달 경로는 정상세포에서 GPR119 리간드에 의하여 활성화 되었지만, PKA 억제에 의한 GPR119 리간드의 collagen I 및 TGFβ 발현 억제 효과는 회복되지 않았다. 이는 GPR119 리간드가 기존에 제시된 신호 전달 경로가 아닌 AMPK 활성화를 통하여 간 섬유화 유도 인자 억제 효과를

나타낼 가능성을 제시한다. 하지만 TGF β 1-Smad2/3 인산화 신호 전달 경로에 대한 GPR119 리간드의 억제 효과는 AMPK 억제를 통하여 부분적으로 반전되었을 뿐 완벽하게 회복시키지는 못하는 것으로 보아 AMPK 활성화 신호 이외의 기전이 존재할 것으로 예측된다. TGF β 에 의한 Smad2/3의 생물학적 활성도(biological activity) 조절은 전사보조활성인자(transcriptional co-activator)인 p300과 상호 작용하여 조절됨이 밝혀져 있다 (60, 61). 정상 피부 및 폐 섬유모세포에서 p300을 형질도입하여 과발현 시켰을 경우 Smad 의존적으로 교원질의 유전자 발현이 증가되고, p300의 발현을 유전적으로 억제하였을 때 TGF β 에 의하여 유도되는 섬유화 인자의 발현이 감소됨이 보고되었다 (62, 63). p300은 Smad2/Smad3의 N-말단 부위(N-terminal region)의 라이신(lysine) 잔기를 아세틸화(acetylation)하여 Smad의 전사적 활성도를 증가시킴으로써 섬유화 유도 인자의 발현을 유도한다 (62). 기존 보고에 따르면 AMPK 활성화는 간 정상세포에서 Smad3와 p300과 상호작용을 경쟁적으로 저해하고 p300의 프로테아좀 분해를 증가시킴으로써 TGF β 1 유도성 collagen 및 α -SMA의 발현 증가를 억제시킨다 (34). 본 연구에서 TGF β 1 처리 시 증가되는 Smad2/Smad3와 p300간의 상호 작용이 GPR119 리간드 처리 시 감소하였고, 이는 AMPK의 p300의 결합 증가와 함께 p300의 프로테아좀 분해 증가에 의한 결과임을 도출하였다. 따라서 GPR119 리간드가 AMPK 신호 전달 경로를 매개로 한 p300과 Smad2/3의 상호작용 제어를 통하여 간 정상세포의 활성화 및 섬유화 유도 인자의 발현을 억제하는 것으로 사료된다.

활성화된 간 성상 세포는 PDGF, EGF (Epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor) 및 IGF (Insulin-like growth factor)에 의하여 증식이 유도되는데 그 중 PDGF가 가장 강력한 성장인자이다 (64). 간 섬유화 유도 과정에서 활성화된 성상세포는 PDGF 수용체 발현이 증가되고 이는 만성적인 간세포 손상 및 염증반응으로 증가된 PDGF에 의하여 수용체의 활성이 증가되며 동시에 PDGF의 분비도 증가하게 된다 (65). 이러한 PDGF의 성상세포의 증식은 p27^{kip1} 억제를 통하여 cyclinE-CDK2 복합체의 S phase의 과정에 대한 촉진에 의하여 유도된다 (66). PDGF는 다양한 질환에서 세포 증식인자로 작용하는데 혈관 평활근 세포 증식 인자로서 혈관내막 과다형성(intimal hyperplasia)을 일으키고, 세포주기의 G1/S checkpoint 주요 조절자인 cyclin D1의 발현을 유도하여 세포의 증식을 유도한다 (21, 67). 특히 PDGF에 의한 세포 주기 조절은 Pin1의 활성화를 통한 cyclin D1의 전사적(transcriptional) 또는 번역후 변형(posttranslational) 과정 조절을 통하여 일어난다 (68). 실제로 Pin1에 의해 조절되는 인자는 cyclin D, cyclin E, p53, p73, p27^{kip1}, β -catenin, MYC, RAF1 등으로 세포주기(cell cycle) 조절에서 중요한 역할을 하고 있으며, Pin1의 과발현은 암의 증식(proliferation) 및 이동능(migration) 획득에 관여하고 세포의 비정상적인 증식을 촉진한다 (69-71). 본 연구에서는 PDGF에 의하여 유도되는 간 성상세포 증식이 GPR119리간드에 의하여 억제되고, PDGF의 증식 조절에 관여하는 Pin1의 발현이 GPR119에 의하여 감소함을 밝혔다. 또한 AMPK 활성화는 Pin1의 발현을 억제하고 Pin1 자체가 AMPK과 직접

결합하여 AMPK 활성을 억제함이 보고 되어 있다 (72, 73). 따라서 GPR119리간드에 의한 Pin1의 억제 및 간 정상세포의 증식 억제 효과는 AMPK 활성화에 기인하는 것으로 예측된다.

GPR119 리간드에 의하여 조절되는 Pin1은 세포 증식 인자 이외에 퇴행성 뇌질환, 만성 염증성 질환, 심혈관계 질환 및 종양형성 등 다양한 병리 과정의 신호전달 경로에 관여함이 보고되어 있다 (18, 74, 75). 기존 보고에 따르면 Pin1이 호산구의 TGF β 의 유전자 발현 및 단백질 안정화에 관여하고, Pin1 결손형 마우스에서 TGF β -Smad3 신호 전달 경로 및 폐 섬유화가 억제되었다 (76). 본 연구에서는 DMN으로 유도한 간 섬유화 조직 및 인간 간 섬유화 조직에서 Pin1 발현이 증가되어 있고 특히 간 섬유화 조직 중 간 정상세포에서 그 발현이 증가되어 있음을 최초로 규명하였다.

간 정상세포의 활성화는 α -SMA의 발현을 특징으로 나타내고 TGF β 1의 발현 증가를 통하여 교원질 등의 세포 외 기질의 축적을 야기한다 (77). 본 연구에서는 간 정상세포에서 Pin1을 과발현시켰을 경우 α -SMA 및 TGF β 1의 발현이 현저히 증가함을 확인하였고 이와 반대로 Pin1의 발현을 저해하였을 때 α -SMA 및 TGF β 1의 발현이 감소하였다. 이는 Pin1이 간 정상세포의 활성화 과정에 관여하고 TGF β 1의 유전자 발현을 조절할 수 있음을 제시한다.

TGF β 1 유전자의 전사 조절은 대표적으로 AP-1, Zf9 및 NF1 등에 의하여 조절됨이 밝혀져 있다 (78, 79). 특히 간 정상세포는 AP-1 활성화에 의하여 collagen I 및 interleukin-8과 같은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진한다 (80,

81). AP-1은 Jun, Fos 또는 ATF family로 구성되어 있으며, 이는 동종이합체(homodimer) 또는 이질이합체(heterodimer) 복합체를 형성하여 TGF β 및 염증성 사이토카인의 발현을 유도한다 (80, 82). AP-1 복합체는 -453과 -323bp 사이에 위치한 2개의 AP-1 결합부위(binding site)를 이용하여 TGF β 1의 유전자 발현 증가 및 자가 유도(auto-induction)를 조절한다 (78, 79). 또한 Pin1은 인산화된 c-Jun/c-Fos의 이성질화(isomerization)에 관여하여 AP-1을 활성화시킨다 (80, 83). 특히 c-Jun의 인산화된 세린 63/67번-프롤린 모티프(Ser 63/67-pro motif)에 결합함으로써 c-Jun에 대한 목적 프로모터(promoter)의 전사적 활성화를 증가시킨다 (17, 82). 본 연구에서는 간 정상세포에서 Pin1을 과발현 시켰을 경우, AP-1 및 TGF β 1 리포터 유전자 활성이 증가됨을 확인하였다. 나아가 AP-1 구성인자 패밀리 중 c-Jun 및 c-Fos가 Pin1에 의하여 선택적으로 활성화되고, 그 중 c-Jun 억제 시 TGF β 1 유전자 발현이 감소되었다. 이는 Pin1이 c-Jun/AP-1 의존적으로 TGF β 1의 전사 활성을 조절함을 의미한다.

Pin1은 TGF β 1에 의하여 활성화된 Smad3에 대한 linker region의 인산화된 쓰레오닌 179번 잔기-프롤린 모티프(Thr 179-proline motif)에 작용하고, Pin1 억제를 통하여 TGF β 1에 의한 세포 이동이 억제됨이 보고되어 있다 (36). 본 연구에서는 기본형 및 TGF β 1 유도성 Smad2/Smad3의 인산화와 SBE 리포터 활성이 Pin1을 억제하였을 경우 현저히 감소되고, TGF β 1에 의하여 유도되는 섬유화 유도 인자인 PAI-1의 발현 또한 Pin1 억제를 통하여 감소됨을

확인하였다. 이는 간 정상세포에서 Pin1이 TGFβ1-Smad 신호 전달 경로 활성화에 관여함을 제시한다. 결론적으로 간 섬유화 과정 중 간 정상세포에서 Pin1은 c-Jun/AP-1 의존적인 TGFβ1 유전자 발현과 TGFβ1-Smad 신호 전달 경로를 조절하는 주요 인자이며, 이는 간 섬유화 예방 및 치료를 위한 새로운 약물 작용점으로 제시될 수 있다.

종합하면 다음과 같다. GPR119는 간세포에 발현되어 있고 GPR119 리간드에 의하여 활성화되었을 경우 AMPK 신호 전달 경로를 매개한 SREBP-1의 활성화 억제를 통하여 간세포 내 지질 축적을 억제할 수 있다. GPR119는 간 정상세포에서도 발현되어 있으며, GPR119 리간드 자극 시 간세포와 마찬가지로 AMPK 활성화를 통하여 정상세포의 활성화 억제 및 TGFβ1 유도성 세포 외 기질 축적을 억제함으로써 간 섬유화를 개선시킬 수 있음을 규명하였다. 또한 간 섬유화 조절의 주요 인자인 Pin1이 간 정상세포의 활성화 및 TGFβ1 유전자 발현 조절과 TGFβ1-Smad2/3 신호 전달 경로를 조절하는 주요 인자임을 도출하였고, GPR119 리간드가 Pin1 발현을 억제한다는 사실을 최초로 규명하였다. 상기 결과들은 GPR119가 비알코올성 지방간 질환 중 초기단계인 지방간 및 마지막 단계인 간 섬유화증에 대한 신규 약물 표적분자로서 효과적인 약물 작용점이 될 수 있음을 제시한다 (Fig. 16).

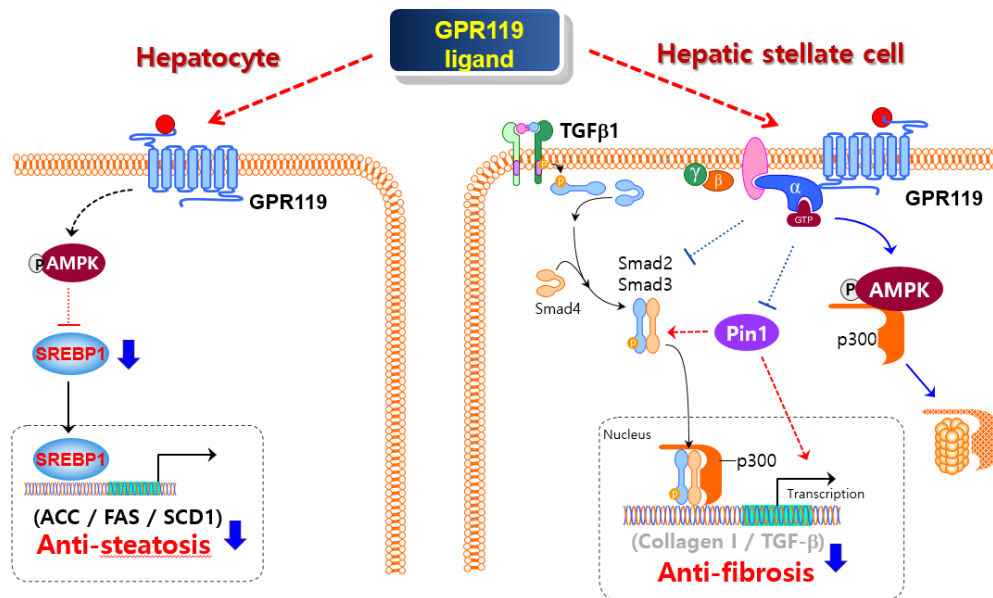


Fig. 16. A schematic diagram illustrating the mechanism by which GPR119 ligand alleviates hepatic steatosis and fibrosis.

V. 참 고 문 헌

1. Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **51**, 679-689
2. Marra, F., Gastaldelli, A., Svegliati Baroni, G., Tell, G., and Tiribelli, C. (2008) Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine* **14**, 72-81
3. Anstee, Q. M., Targher, G., and Day, C. P. (2013) Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**, 330-344
4. Birkenfeld, A. L., and Shulman, G. I. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology* **59**, 713-723
5. Smith, B. W., and Adams, L. A. (2011) Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 456-465
6. Friedman, S. L. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655-1669
7. Bataller, R., and Brenner, D. A. (2005) Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **115**, 209-218
8. Friedman, S. L. (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* **88**, 125-172
9. Soga, T., Ohishi, T., Matsui, T., Saito, T., Matsumoto, M., Takasaki, J., Matsumoto, S., Kamohara, M., Hiyama, H., Yoshida, S., Momose, K., Ueda, Y.,

- Matsushime, H., Kobori, M., and Furuichi, K. (2005) Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **326**, 744-751
10. Chu, Z. L., Carroll, C., Alfonso, J., Gutierrez, V., He, H., Lucman, A., Pedraza, M., Mondala, H., Gao, H., Bagnol, D., Chen, R., Jones, R. M., Behan, D. P., and Leonard, J. (2008) A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology* **149**, 2038-2047
 11. Chu, Z. L., Carroll, C., Chen, R., Alfonso, J., Gutierrez, V., He, H., Lucman, A., Xing, C., Sebring, K., Zhou, J., Wagner, B., Unett, D., Jones, R. M., Behan, D. P., and Leonard, J. (2010) N-oleoyldopamine enhances glucose homeostasis through the activation of GPR119. *Mol Endocrinol* **24**, 161-170
 12. Hansen, H. S., Rosenkilde, M. M., Holst, J. J., and Schwartz, T. W. (2012) GPR119 as a fat sensor. *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 374-381
 13. Kang, S.-U. (2013) GPR119 agonists: a promising approach for T2DM treatment? A SWOT analysis of GPR119. *Drug discovery today* **18**, 1309-1315
 14. Cornall, L. M., Mathai, M. L., Hryciw, D. H., Simcocks, A. C., O'Brien, P. E., Wentworth, J. M., and McAinch, A. J. (2013) GPR119 regulates genetic markers of fatty acid oxidation in cultured skeletal muscle myotubes. *Molecular and cellular endocrinology* **365**, 108-118
 15. Yonezawa, T., Kurata, R., Yoshida, K., Murayama, M. A., Cui, X., and Hasegawa, A. (2013) Free fatty acids-sensing G protein-coupled receptors in drug targeting

- and therapeutics. *Curr Med Chem* **20**, 3855-3871
16. Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., and Lotersztajn, S. Cannabinoid signaling and liver therapeutics. *Journal of hepatology* **59**, 891-896
 17. Liou, Y.-C., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2011) Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends in biochemical sciences* **36**, 501-514
 18. Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K. P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular cell* **6**, 873-883
 19. Kim, M. R., Choi, H. K., Cho, K. B., Kim, H. S., and Kang, K. W. (2009) Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer science* **100**, 1834-1841
 20. Shen, Z. J., Esnault, S., Rosenthal, L. A., Szakaly, R. J., Sorkness, R. L., Westmark, P. R., Sandor, M., and Malter, J. S. (2008) Pin1 regulates TGF-beta1 production by activated human and murine eosinophils and contributes to allergic lung fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **118**, 479-490
 21. Kim, S. E., Lee, M. Y., Lim, S. C., Hien, T. T., Kim, J. W., Ahn, S. G., Yoon, J. H., Kim, S. K., Choi, H. S., and Kang, K. W. (2010) Role of Pin1 in neointima formation: down-regulation of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 expression by Pin1. *Free radical biology & medicine* **48**, 1644-1653
 22. Shen, Z. J., Esnault, S., and Malter, J. S. (2005) The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates the stability of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

- mRNA in activated eosinophils. *Nature immunology* **6**, 1280-1287
23. Klaunig, J. E., Goldblatt, P. J., Hinton, D. E., Lipsky, M. M., Chacko, J., and Trump, B. F. (1981) Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In vitro* **17**, 913-925
 24. Maschmeyer, P., Flach, M., and Winau, F. (2011) Seven Steps to Stellate Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2710
 25. Kang, K. W., Cho, I. J., Lee, C. H., and Kim, S. G. (2003) Essential Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent CCAAT/Enhancer Binding Protein β Activation in the Induction of Glutathione S-Transferase by Oltipraz. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 53-66
 26. Cho, I. J., and Kim, S. G. (2003) Oltipraz Inhibits 3-Methylcholanthrene Induction of CYP1A1 by CCAAT/Enhancer-binding Protein Activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 44103-44112
 27. Kang, K. W., Choi, S. Y., Cho, M. K., Lee, C. H., and Kim, S. G. (2003) Thrombin Induces Nitric-oxide Synthase via G α 12/13-coupled Protein Kinase C-dependent I- κ B α Phosphorylation and JNK-mediated I- κ B α Degradation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17368-17378
 28. Ferré, P., and Foufelle, F. (2010) Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **12**, 83-92
 29. Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* **109**, 1125-1131

30. Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A., and Zang, M. (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell metabolism* **13**, 376-388
31. Hwahng, S. H., Ki, S. H., Bae, E. J., Kim, H. E., and Kim, S. G. (2009) Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology* **49**, 1913-1925
32. Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., and Cohen, R. A. (2006) Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* **55**, 2180-2191
33. Cho, I. J., Kim, Y. W., Han, C. Y., Kim, E. H., Anderson, R. A., Lee, Y. S., Lee, C. H., Hwang, S. J., and Kim, S. G. (2010) E-cadherin antagonizes transforming growth factor beta1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology* **52**, 2053-2064
34. Lim, J.-Y., Oh, M.-A., Kim, W. H., Sohn, H.-Y., and Park, S. I. (2012) AMP-activated protein kinase inhibits TGF- β -induced fibrogenic responses of hepatic stellate cells by targeting transcriptional coactivator p300. *Journal of cellular physiology* **227**, 1081-1089
35. Kim, S. E., Lee, M. Y., Lim, S. C., Hien, T. T., Kim, J. W., Ahn, S.-G., Yoon, J.-

- H., Kim, S. K., Choi, H. S., and Kang, K. W. (2010) Role of Pin1 in neointima formation: Down-regulation of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 expression by Pin1. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 1644-1653
36. Matsuura, I., Chiang, K. N., Lai, C. Y., He, D., Wang, G., Ramkumar, R., Uchida, T., Ryo, A., Lu, K., and Liu, F. (2010) Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *The Journal of biological chemistry* **285**, 1754-1764
 37. Kirmaz, C., Terzioglu, E., Topalak, O., Bayrak, P., Yilmaz, O., Ersoz, G., and Sebik, F. (2004) Serum transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C [corrected]. *European cytokine network* **15**, 112-116
 38. CymaBay Therapeutics, I. (2015) Study to Evaluate the Efficacy, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MBX-2982 Administered Daily for 4 Weeks as Monotherapy in Patients With Type 2 Diabetes. In: ClinicalTrials.gov Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2009-[cited 2015 Mar 30]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01035879> NLM Identifier: NCT01035879.
 39. Lan, H., Vassileva, G., Corona, A., Liu, L., Baker, H., Golovko, A., Abbondanzo, S. J., Hu, W., Yang, S., Ning, Y., Del Vecchio, R. A., Poulet, F., Lavery, M., Gustafson, E. L., Hedrick, J. A., and Kowalski, T. J. (2009) GPR119 is required for physiological regulation of glucagon-like peptide-1 secretion but not for metabolic homeostasis. *The Journal of endocrinology* **201**, 219-230

40. James A. Bonini, B. E. B., Nika Adham, Noel Boyle, Thelma O. Thompson. (2002) Methods of identifying compounds that bind to SNORF25 receptors. *U.S. Patent 6,468,756*.
41. Saltiel, A. R., and Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806
42. Kammoun, H. L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferre, P., and Fofelle, F. (2009) GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1201-1215
43. Xiao, X., and Song, B. L. (2013) SREBP: a novel therapeutic target. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **45**, 2-10
44. Gupta, N. A., Mells, J., Dunham, R. M., Grakoui, A., Handy, J., Saxena, N. K., and Anania, F. A. (2010) Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology* **51**, 1584-1592
45. Ding, X., Saxena, N. K., Lin, S., Gupta, N., and Anania, F. A. (2006) Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* **43**, 173-181
46. Lindsay, J. R., Duffy, N. A., McKillop, A. M., Ardill, J., O'Harte, F. P. M., Flatt, P. R., and Bell, P. M. (2005) Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* **22**, 654-657
47. Gedulin, B. R., Nikoulina, S. E., Smith, P. A., Gedulin, G., Nielsen, L. L., Baron, A. D., Parkes, D. G., and Young, A. A. (2005) Exenatide (exendin-4) improves

- insulin sensitivity and β -cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology* **146**, 2069-2076
48. Nauck, M. A., and Meier, J. J. (2005) Glucagon-like peptide 1 and its derivatives in the treatment of diabetes. *Regulatory Peptides* **128**, 135-148
 49. Nunez, D. J., Bush, M. A., Collins, D. A., McMullen, S. L., Gillmor, D., Apseloff, G., Atiee, G., Corsino, L., Morrow, L., and Feldman, P. L. (2014) Gut hormone pharmacology of a novel GPR119 agonist (GSK1292263), metformin, and sitagliptin in type 2 diabetes mellitus: results from two randomized studies. *PloS one* **9**, e92494
 50. Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006) Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of clinical investigation* **116**, 607-614
 51. Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., and Shan, B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & development* **14**, 2831-2838
 52. Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodriguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., and Piomelli, D. (2003) Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* **425**, 90-93
 53. Zhang, B. B., Zhou, G., and Li, C. (2009) AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism* **9**, 407-416
 54. Mihaylova, M. M., and Shaw, R. J. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology* **13**, 1016-1023

55. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *New England Journal of Medicine* **346**, 1221-1231
56. Puche, J. E., Saiman, Y., and Friedman, S. L. (2011) Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. In *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Inc.
57. Caligiuri, A., Bertolani, C., Guerra, C. T., Aleffi, S., Galastri, S., Trappoliere, M., Vizzutti, F., Gelmini, S., Laffi, G., Pinzani, M., and Marra, F. (2008) Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulates the activated phenotype of hepatic stellate cells. *Hepatology* **47**, 668-676
58. Ramezani-Moghadam, M., Wang, J., Ho, V., Iseli, T. J., Alzahrani, B., Xu, A., Van der Poorten, D., Qiao, L., George, J., and Hebbard, L. (2015) Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) secretion. *The Journal of biological chemistry* **290**, 5533-5542
59. Adachi, M., and Brenner, D. A. (2008) High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* **47**, 677-685
60. Ghosh, A. K., and Varga, J. (2007) The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *Journal of cellular physiology* **213**, 663-671
61. Ghosh, A. K., Yuan, W., Mori, Y., and Varga, J. (2000) Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene* **19**, 3546-3555

62. Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2006) Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene* **26**, 500-508
63. Tu, A. W., and Luo, K. (2007) Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *The Journal of biological chemistry* **282**, 21187-21196
64. Pinzani, M., Gesualdo, L., Sabbah, G. M., and Abboud, H. E. (1989) Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *The Journal of clinical investigation* **84**, 1786-1793
65. Pinzani, M., Milani, S., Herbst, H., DeFranco, R., Grappone, C., Gentilini, A., Caligiuri, A., Pellegrini, G., Ngo, D. V., Romanelli, R. G., and Gentilini, P. (1996) Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *The American journal of pathology* **148**, 785-800
66. Li, A., Wang, J., Wu, M., Zhang, X., and Zhang, H. (2015) The inhibition of activated hepatic stellate cells proliferation by arctigenin through G0/G1 phase cell cycle arrest: Persistent p27Kip1 induction by interfering with PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* **747**, 71-87
67. Goukassian, D., Sanz-González, S. M., Pérez-Roger, I., Font de Mora, J., Ureña, J., and Andrés, V. (2001) Inhibition of the cyclin D1/E2F pathway by PCA-4230, a potent repressor of cellular proliferation. *British journal of pharmacology* **132**,

1597-1605

68. Ryo, A., Liou, Y.-C., Wulf, G., Nakamura, M., Lee, S. W., and Lu, K. P. (2002) PIN1 Is an E2F Target Gene Essential for Neu/Ras-Induced Transformation of Mammary Epithelial Cells. *Molecular and cellular biology* **22**, 5281-5295
69. Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P., and Wang, D.-G. (2004) Prevalent Overexpression of Prolyl Isomerase Pin1 in Human Cancers. *The American journal of pathology* **164**, 1727-1737
70. Wulf, G. M., Ryo, A., Wulf, G. G., Lee, S. W., Niu, T., Petkova, V., and Lu, K. P. (2001) *Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1* Vol. 20
71. Brenkman, A. B., de Keizer, P. L. J., van den Broek, N. J. F., van der Groep, P., van Diest, P. J., van der Horst, A., Smits, A. M. M., and Burgering, B. M. T. (2008) The Peptidyl-Isomerase Pin1 Regulates p27kip1 Expression through Inhibition of Forkhead Box O Tumor Suppressors. *Cancer research* **68**, 7597-7605
72. Ki, S. H., Lee, J.-W., Lim, S. C., Hien, T. T., Im, J. H., Oh, W. K., Lee, M. Y., Ji, Y. H., Kim, Y. G., and Kang, K. W. (2013) Protective effect of nectandrin B, a potent AMPK activator on neointima formation: inhibition of Pin1 expression through AMPK activation. *British journal of pharmacology* **168**, 932-945
73. Lee, N. Y., Choi, H.-K., Shim, J.-H., Kang, K.-W., Dong, Z., and Choi, H. S. (2009) The prolyl isomerase Pin1 interacts with a ribosomal protein S6 kinase to enhance insulin-induced AP-1 activity and cellular transformation. *Carcinogenesis* **30**, 671-681
74. Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-

- tasking kinase. *Journal of cell science* **116**, 1175-1186
75. Jeong, H. G., Pokharel, Y. R., Lim, S. C., Hwang, Y. P., Han, E. H., Yoon, J. H., Ahn, S. G., Lee, K. Y., and Kang, K. W. (2009) Novel role of Pin1 induction in type II collagen-mediated rheumatoid arthritis. *J Immunol* **183**, 6689-6697
 76. Shen, Z. J., Braun, R. K., Hu, J., Xie, Q., Chu, H., Love, R. B., Stodola, L. A., Rosenthal, L. A., Szakaly, R. J., Sorkness, R. L., and Malter, J. S. (2012) Pin1 protein regulates Smad protein signaling and pulmonary fibrosis. *The Journal of biological chemistry* **287**, 23294-23305
 77. Qi, Z., Atsuchi, N., Ooshima, A., Takeshita, A., and Ueno, H. (1999) Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2345-2349
 78. Kim, S. J., Glick, A., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1989) Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *The Journal of biological chemistry* **264**, 402-408
 79. Kim, Y., Ratzliff, V., Choi, S. G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S. J., and Friedman, S. L. (1998) Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *The Journal of biological chemistry* **273**, 33750-33758
 80. Joshi-Barve, S., Barve, S. S., Amancherla, K., Gobejishvili, L., Hill, D., Cave, M., Hote, P., and McClain, C. J. (2007) Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* **46**, 823-

81. Zhang, Y., and Yao, X. (2012) Role of c-Jun N-terminal kinase and p38/activation protein-1 in interleukin-1beta-mediated type I collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **120**, 101-107
82. Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D., and Gutkind, J. S. (2005) Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35081-35084
83. Wulf, G. M., Ryo, A., Wulf, G. G., Lee, S. W., Niu, T., Petkova, V., and Lu, K. P. (2001) Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *The EMBO journal* **20**, 3459-3472

VI. Abstract

Inhibition of hepatic steatosis and fibrosis by GPR119 ligands

Jin Won Yang

Advisor: Prof. Keon Wook Kang

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a wide spectrum of liver diseases including steatosis (fatty liver) which shows massive triglyceride deposition in hepatocytes, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) with hepatocyte injury and inflammation, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The elevated lipogenesis of fatty acids are the distinct feature of steatosis, which is associated with insulin resistance and give rise to severe liver damage and fibrosis. Nevertheless, therapeutic management of hepatic steatosis and fibrosis has been one of the unsolved clinical problems.

G-protein-coupled receptor 119 (GPR119) is a therapeutic potential for type 2 diabetes mellitus. However, the role of GPR119 activation in hepatic steatosis and fibrosis and its precise mechanism has not been determined. A previous study showed that GPR119 was mainly expressed in pancreatic islets and gastrointestinal tract, but not in liver tissues.

Results of the present study revealed for the first time that GPR119 was expressed in hepatocytes and hepatic stellate cells (HSCs). The basal expression of lipogenic enzymes and LXR ligand (T0901317)-induced SREBP-1 expression, an important lipogenesis transcription factor was enhanced in primary cultured hepatocytes isolated from GPR119 knock out (KO) mice as compared to those from GPR119 wild type (WT) mice. GPR119 ligands in phase II clinical trials (MBX-2982 and GSK1292263) inhibited SREBP-1-mediated induction of lipogenic enzymes and lipid accumulation in primary cultured hepatocytes exposed to high glucose and insulin. In high fat diet (HFD)-induced hepatic steatosis animal model, administration of MBX-2982 and GSK1292263 reduced the hepatic expression of SREBP-1 and lipogenic enzymes, and hepatic lipid accumulation was also significantly suppressed by MBX-2982 administration. Whereas, the anti-steatotic effect of GPR119 ligand was abolished in GPR119 KO mice. MBX-2982 activated AMP-activated protein kinase (AMPK) and stimulated phosphorylation of Ser-372 SREBP-1c, an inhibitory form of SREBP-1c. Moreover, MBX-2982-induced down regulation of SREBP-1 was recovered by AMPK inhibition.

End stage of NASH is accompanied by liver fibrosis and cirrhosis. Because GPR119 was obviously expressed in HSCs, I was interested in clarifying the role of GPR119 in hepatic fibrogenesis. In primary cultured HSCs or a human stellate cell line, LX-2 cells, MBX-2982 inhibited the activation of HSCs and TGF β 1-induced Smad2/3 phosphorylation and expression of fibrogenic genes. In carbon tetrachloride (CCl₄)-

induced liver fibrosis model, MBX-2982 treatment attenuated the hepatic accumulation of collagen and expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and transforming growth factor β (TGF β). MBX-2982 also activated AMPK in HSCs. MBX-2982-mediated AMPK activation was linked to the inhibition of TGF β 1-induced fibrogenic genes expression. MBX-2982 reduced TGF β 1-stimulated Smad3 binding with transcriptional co-activator p300 in accordance with reduction of Smad3 acetylation. MBX-2982 enhanced protein interaction between AMPK and p300, which subsequently caused proteasomal degradation of p300.

I further found that MBX-2982 inhibited platelet derived growth factor (PDGF)-induced cell proliferation and the expression of peptidyl-prolyl isomerase (Pin1) in HSCs. Pin1 functions as a master regulator for diverse signaling molecules important for cell-cycle progression. Pin1 plays a pivotal role in several diseases including neurodegeneration, pulmonary fibrosis and cancer. I identified that Pin1 was overexpressed in either fibrotic liver homogenates isolated from dimethylnitrosamine (DMN)-treated mice or human fibrotic liver tissues. Pin1 inhibition by juglone or shRNA decreased α -SMA protein expression and TGF β 1 mRNA levels in HSCs. Pin1-mediated c-Jun/activator protein-1 (AP-1) activation was involved in the regulation of TGF β 1 gene transcription. Pin1 knockdown inhibited TGF β 1-induced Smad2/3 phosphorylation and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression.

Overall, GPR119 is expressed in hepatocytes and HSCs. I demonstrate for the first

time that GPR119 ligand regulates hepatic steatosis by inhibiting SREBP-1-mediated lipogenesis gene expression, and prevents liver fibrogenesis by inhibiting the activation of HSCs and TGF β 1-mediated Smad activation. GPR119 ligand also inhibited proliferation of HSCs and Pin1 expression. Pin1 is a crucial factor for HSC activation and TGF β 1 gene expression. GPR119 is a potential therapeutic target of hepatic steatosis and fibrosis, and its ligand may be a candidate for anti-NAFLD therapy.

Keywords: hepatic steatosis, hepatic fibrosis, GPR119, Pin1, new drug target

Student Number: 2007-30471

VII. Curriculum Vitae

NAME : Jin Won Yang
DATE OF BIRTH : November 22, 1981
ADDRESS : 29-309, College of Pharmacy, Seoul National University
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Korea, 151-742
Tel: +822-880-7840
Fax: +822-872-1795
Cellular phone: +82-10-6285-2210
E-mail: fxzxt@snu.ac.kr

EDUCATION

Aug. 2015 **Ph.D. in Pharmacology (concentration: Molecular Pharmacology)**
Seoul National University, Seoul, Korea

Dissertation title: Inhibition of hepatic steatosis and fibrosis by GPR119 ligands
Advisor: Keon Wook Kang, Ph.D., Professor of Pharmacology

Feb. 2005 **Bachelor of Pharmacy**
Chosun University, Gwang-ju, South Korea

EXPERIENCE

- Feb. 2012– present* **Research student, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Seoul National University, Korea**
- Identification of molecular target and pharmacology study for the development of NAFLD (steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis) and therapeutic agent
 - Various animal and cellular experiments
- Feb. 2009– Feb. 2012* **Researcher, Service with Pharmaceutical Company Samil Pharm. Co., Ltd.**
- Target validation of new drugs in chronic liver diseases and cancer
- Feb. 2007– Feb. 2009* **Ph.D. Graduate Student of Pharmacology, College of Pharmacy, Seoul National University, Korea**
- GPCR-G protein signaling ($G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$) and gene regulation
 - Identification of molecular target for epithelial mesenchymal transition (EMT) in liver cancer.
- Feb. 2005– Feb. 2007* **M.S. Graduate Student of Pharmacology, College of Pharmacy, Chosun University, Korea**
- Identification of molecular target and pharmacology study for breast cancer and tamoxifen-resistance breast cancer

PROFESSIONAL LICENSE

1. Pharmacist license, 2005

TECHNICAL EXPERIENCE

Animal experiments

1. Experimental liver diseases animal models
 - High-fat diet (HFD)-induced obesity model
 - Methionine-choline deficient diet (MCD)-induced NASH model
 - Choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet (CDAHFD)-induced NASH model
 - CCl₄ or bile duct ligation (BDL)-induced fibrosis model
2. Knockout mice model, HBx transgenic mice model
3. Xenografts in nude mice

Isolation of primary cells

1. Primary hepatocytes from mouse and rat
2. Primary hepatic stellate cells from mouse and rat
3. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from mouse and rat
4. Primary aorta smooth muscle cells from mouse and rat

Related skills

- Western blot, immunoprecipitation, gel shift assays, real-time PCR, gene-knockdown with siRNA and shRNA, immunocytochemistry, ChIP assay

RESEARCH INTERESTS

1. Lipid metabolism in NAFLD
2. Cell to cell interaction in chronic liver diseases and cancer
3. Identification of molecular targets for pharmacological treatment of hepato-metabolic diseases (i.e. hepatitis, NASH, fibrosis) and insulin resistance-associated metabolic syndrome
4. AMPK regulation and related signaling
5. GPCR-G protein signaling ($G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$)
6. Molecular mechanism and regulation of adipocytes differentiation
7. Cellular signaling and the regulation of gene expression

PRESENTATIONS (International oral presentation)

1. Yang JW, Kang KW* (2014) Role of Pin1 in hepatic fibrosis. The 8th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists. June, 10-11, Sanwa Hall, Ichon-kaikan, Osaka University, Japan

AWARDS AND HONORS

1. Feb. 2013: Award for great poster presentation, Korean Society of Toxicology
2. Feb. 2007: Award for research achievements, Chosun University, Gwang-Ju, Korea

PUBLICATIONS

14. Park JH, Lee GE, Lee SD, Hien TT, Kim S, **Yang JW**, Cho JH, Ko H, Lim SC, Kim YG, et al. Discovery of Novel 2,5-Dioxoimidazolidine-based P2X7 Receptor Antagonists as Constrained Analogues of KN62. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;Epub ahead of print.
13. **Yang JW**, Hien TT, Lim SC, Jun DW, Choi HS, Yoon JH, Cho IJ, and Kang KW. Pin1 induction in the fibrotic liver and its roles in TGF-beta1 expression and Smad2/3 phosphorylation. *Journal of hepatology*. 2014;60(6):1235-41.
12. Hien TT, Ki SH, **Yang JW**, Oh WK, and Kang KW. Nectandrin B suppresses the expression of adhesion molecules in endothelial cells: Role of AMP-activated protein kinase activation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014;66(286-94).
11. Lee SJ, **Yang JW**, Cho IJ, Kim WD, Cho MK, Lee CH, and Kim SG. The gep oncogenes, Galpha(12) and Galpha(13), upregulate the transforming growth factor-beta1 gene. *Oncogene*. 2009;28(9):1230-40.
10. Kim MR, Choi HS, **Yang JW**, Park BC, Kim JA, and Kang KW. Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(8):2163-71.
9. **Yang JW**, Kim MR, Kim HG, Kim SK, Jeong HG, and Kang KW. Differential

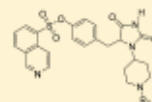
- regulation of ErbB2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Archives of pharmacal research*. 2008;31(3):350-6.
8. Kim SK, **Yang JW**, Kim MR, Roh SH, Kim HG, Lee KY, Jeong HG, and Kang KW. Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(4):537-46.
 7. Lee JY, Han CY, **Yang JW**, Smith C, Kim SK, Lee EY, Kim SG, and Kang KW. Induction of glutathione transferase in insulin-like growth factor type I receptor-overexpressed hepatoma cells. *Molecular pharmacology*. 2007;72(4):1082-93.
 6. Choi HK, **Yang JW**, Roh SH, Han CY, and Kang KW. Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(2):293-303.
 5. **Yang JW**, Yoon SY, Oh SJ, Kim SK, and Kang KW. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(1):345-50.
 4. **Yang JW**, Pokharel YR, Kim MR, Woo ER, Choi HK, and Kang KW. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumafavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;105(1-2):107-13.
 3. **Yang JW**, Lee EY, and Kang KW. ErbB2 overexpression in p53-inactivated

- mammary epithelial cells. *FEBS letters*. 2006;580(27):6501-8.
2. Woo ER, Pokharel YR, **Yang JW**, Lee SY, and Kang KW. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation by 2',8"-biapigenin. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(5):976-80.
 1. Pokharel YR, **Yang JW**, Kim JY, Oh HW, Jeong HG, Woo ER, and Kang KW. Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2006;15(3):217-25.

Discovery of Novel 2,5-Dioximidazolidine-Based P2X₇ Receptor Antagonists as Constrained Analogues of KN62Jin-Hee Park,^{†,▽} Ga-Eun Lee,^{†,▽} So-Deok Lee,[†] Tran Thi Hien,^{||} Sujin Kim,[†] Jin Won Yang,[§] Joong-Heui Cho,[†] Hyojin Ko,[†] Sung-Chul Lim,[⊥] Yoon-Gyoon Kim,[@] Keon-Wook Kang,^{*,§} and Yong-Chul Kim^{*,†}[†]School of Life Sciences, Gwangju Institute of Science and Technology (GIST), Gwangju 500-712, Republic of Korea[‡]Department of Pharmaceutical Industry, Korea Health Industry Development Institute(KHIDI), Chungcheongbuk-do 363-700, Republic of Korea[§]College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea^{||}College of Pharmacy and [⊥]Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea[@]College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

Supporting Information

ABSTRACT: Novel 2,5-dioximidazolidine-based conformationally constrained analogues of KN62 (**1**) were developed as P2X₇ receptor (P2X₇R) antagonists using a rigidification strategy of the tyrosine backbone of **1**. SAR analysis of the 2,5-dioximidazolidine scaffold indicated that piperidine substitution at the N3 position and no substitution at N1 position were preferable. Further optimization of the substituents at the piperidine nitrogen and the spacer around the skeleton resulted in several superior antagonists to **1**, including 1-adamantanecarbonyl analogue **21i** (IC₅₀ = 23 nM in ethidium uptake assay; IC₅₀ = 14 nM in IL-1β ELISA assay) and (3-CF₃-4-Cl)benzoyl analogue (–)-**21w** (54 nM in ethidium uptake assay; 9 nM in IL-1β ELISA assay), which was more potent than the corresponding (+) isomer. Compound **21w** displayed potent inhibitory activity in an ex vivo model of LTP-induced pain signaling in the spinal cord and significant anti-inflammatory activity in vivo models of carrageenan-induced paw edema and type II collagen-induced joint arthritis.



Compd	R ₃	IC ₅₀ (nM)	
		EthBr Uptake in AP2X ₇ -expressing HEK293 Cells	IL-1β Release in Differentiated THP-1 Cells
21i	1-adamantanecarbonyl	23 ± 9	14 ± 2
(–)-21w	(3-CF ₃ -4-Cl)PhCO	54 ± 1	9 ± 2

INTRODUCTION

Purinergic P2X receptors, cation-selective ion channels gated by extracellular ATP, are divided into seven receptor subtypes, P2X₁–P2X₇.^{1,2} According to a recent report regarding the crystal structure of the xP2X₄ receptor, these receptors exist as a trimeric subunit, with each subunit consisting of two continuous transmembrane α -helices, an intracellular terminus, and a large extracellular domain rich with disulfide bonds.³ In particular, the P2X₇ receptor (P2X₇R), first identified from the rat brain in 1996,⁴ is distinct compared with the other P2X receptor subtypes because it has a considerably longer C-terminus, with an additional 100–200 amino acids.⁵ Brief exposure of P2X₇R to the agonist ATP facilitates a transient current through the opening of cation channels, thereby triggering depolarization, homeostasis of Na⁺ and K⁺, and the massive influx of Ca²⁺.^{1,2,5} This process leads to activation of a diverse range of signal transduction pathways related to inflammatory signals, including phospholipase A₂, phospholipase D, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the nuclear κ B factor.⁶ Furthermore, repeated or sustained activation of the receptors of extracellular ATP induces large and nonspecific pore formation.⁵ The formation of an enlarged pore

allows the penetration of positively charged hydrophilic solutes, such as ethidium bromide and YO-Pro-1, which has a molecular mass of up to 900 Da.⁷ Pannexin-1, which acts as a plasma membrane hemichannel, was recently reported to be explicitly involved in the formation of the large pore of P2X₇R.^{8,9}

P2X₇R is primarily expressed in hematopoietic-derived immune cells, including mast cells and macrophages, and in brain glial cells, including microglia and astrocytes.^{6,10} The most important role of P2X₇R in the production of IL-1β in activated monocytes, macrophages, and microglia is part of a complex sequence of events. Initially, the activation of P2X₇R triggers K⁺ efflux, leading to stimulation of the IL-1β-converting enzyme (caspase-1) in the NLRP3/NALP3 inflammasome, which converts pro-IL-1β to mature IL-1β.^{11–13}

Interleukin-1β (IL-1β) is a cytokine protein belonging to the interleukin-1 (IL-1) family. IL-1, along with tumor-necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 is a major mediator of innate immune reactions that play central roles in the development of pathological conditions leading to inflammation and chronic pain.^{11,14,15}

Received: February 28, 2014

Published: January 18, 2015



Pin1 induction in the fibrotic liver and its roles in TGF- β 1 expression and Smad2/3 phosphorylation

Jin Won Yang^{1,†}, Tran Thi Hien^{2,†}, Sung Chul Lim³, Dae Won Jun⁴, Hong Seok Choi², Jung-Hoon Yoon⁵, Il Je Cho⁶, Keon Wook Kang^{1,*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea; ²College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea; ³Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea; ⁴Department of Internal Medicine, Han Yang University, Seoul 133-791, Republic of Korea; ⁵Department of Oral & Maxillofacial Pathology, College of Dentistry, Daejeon Dental Hospital, Wonkwang University, Daejeon 302-120, Republic of Korea; ⁶Medical Research Center for Globalization of Herbal Formulation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongsangbuk-do 712-715, Republic of Korea

Background & Aims: Therapeutic management of liver fibrosis remains an unsolved clinical problem. Hepatic accumulation of extracellular matrix, mainly collagen, is mediated by the production of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in stellate cells. Pin1, a peptidyl-prolyl isomerase, plays an important pathophysiological role in several diseases, including neurodegeneration and cancer. Herein, we determined whether Pin1 regulates liver fibrogenesis and examined its mechanism of action by focusing on TGF- β 1 signalling and hepatic stellate cell (HSC) activation.

Methods: Pin1 expression was assessed by immunohistochemistry, Western blot or real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses of human and mouse fibrotic liver samples. The role of Pin1 during HSC activation was estimated using Pin1-null mouse embryonic fibroblast (MEF) cells and Pin1-overexpressing LX-2 human hepatic stellate cells.

Results: Pin1 expression was elevated in human and mouse fibrotic liver tissues, and Pin1 inhibition improved dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis in mice. Pin1 inhibition reduced the mRNA or protein expression of TGF- β 1 and α -smooth muscle actin (α -SMA) by DMN treatment. Pin1 knockdown suppressed TGF β 1 gene expression in both LX-2 and MEF cells. Pin1-mediated TGF β 1 gene transcription was controlled by extra-

cellular signal-regulated kinase (ERK)- and phosphoinositide 3-kinase/Akt-mediated activator protein-1 (AP-1) activation. Moreover, TGF β 1-stimulated Smad2/3 phosphorylation and plasminogen activator inhibitor-1 expression were inhibited by Pin1 knockdown.

Conclusions: Pin1 induction during liver fibrosis is involved in hepatic stellate cell activation, TGF β 1 expression, and TGF β 1-mediated fibrogenesis signalling.

© 2014 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Liver fibrosis, characterised by the accumulation of the extracellular matrix (ECM), including collagens, is an early stage of cirrhosis associated with chronic viral hepatitis and alcoholic or non-alcoholic fatty liver diseases [1]. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) plays a central role in the regulation of many cellular processes including growth, ECM formation, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [1]. Serum TGF β 1 levels have been shown to be significantly higher in patients with alcoholic and viral liver cirrhosis [2], and hepatocellular carcinoma [3]. It has also been reported that local induction of TGF β 1 from the autocrine or paracrine pathway is crucial for the activation of hepatic stellate cells (HSCs) and the production of ECM proteins leading to liver cirrhosis [4].

Pin1, a unique prolyl isomerase, is an enzyme that specifically recognises phosphorylated serine or threonine immediately to proline. Promoting the cis-trans isomerisation of the peptide bond, Pin1 regulates the catalytic activities of various enzymes via changes in phosphorylation status, protein interaction, subcellular localisation, and protein stability [5]. Pin1 is frequently overexpressed in several types of cancer tissues and is involved in the regulation of cancer cell proliferation, angiogenesis, and the epithelial-mesenchymal transition [6]. It has been also revealed that Pin1 shows a deleterious effect on chronic inflammation diseases such as hepatitis B virus

Keywords: Liver fibrosis; Pin1; TGF- β 1; Smad2/3.

Received 26 July 2013; received in revised form 4 February 2014; accepted 5 February 2014; available online 13 February 2014

* Corresponding author. Address: College of Pharmacy, Seoul National University, Daehakro 1, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea. Tel.: +82 2 880 7851; fax: +82 2 872 1795.

E-mail address: kwkang@nu.ac.kr (K.W. Kang).

[†] These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; HSC, hepatic stellate cell; RT-PCR, real-time-polymerase chain reaction; MEF, mouse embryonic fibroblast; DMN, dimethylnitrosamine; α -SMA, α -smooth muscle actin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; AP-1, activator protein-1; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-mesenchymal transition; S16r, S16 ribosomal protein; Pin1-LX-2, Pin1 overexpressing LX-2 cells; MSCV-GFP, murine stem cell viral-green fluorescence protein; GFP-LX-2, GFP-overexpressing LX-2 cells; ZB, zinc finger transcription factor 9; NF1, nuclear factor 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; PAI-1, Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).



FLSFVIFR



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Nectandrin B suppresses the expression of adhesion molecules in endothelial cells: Role of AMP-activated protein kinase activation



Tran Thi Hien^a, Sung Hwan Ki^a, Jin Won Yang^b, Won Keun Oh^b, Keon Wook Kang^{b,*}

^a College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

^b College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2013

Accepted 30 January 2014

Available online 8 February 2014

Keywords:

Nectandrin B

Adhesion molecules

AMPK

Endothelial cells

ABSTRACT

We have previously shown that nectandrin B, a potent natural activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) results in endothelium-dependent relaxation via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. This study examined the effects of nectandrin B on monocyte adhesion and on the expression of adhesion molecules in endothelial cells, an initial event in atherogenesis. Nectandrin B inhibited tumor necrosis factor- α (TNF α)-induced monocyte THP-1 cell adhesion to ECV 304 human endothelial cells. This lignan also suppressed TNF α -induced protein and mRNA expression of two cell adhesion molecules, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1). In addition, expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase were diminished by nectandrin B treatment. Reporter gene and immunoblot analyses revealed that transcription factor activities of nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), and cyclic AMP response element binding protein (CREB) were inhibited by nectandrin B. Moreover, nectandrin B activated AMP-activated protein kinase (AMPK) in ECV 304 cells. Transfection of a dominant-negative mutant form of AMPK (DN-AMPK) partially reversed inhibitory effects of nectandrin B on the expression of VCAM-1 and ICAM-1, and on the transcriptional activity of CREB.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Endothelial dysfunction is believed to be a primary cause of atherosclerosis, through progressive events characterized by up-regulation of cell adhesion molecules, recruitment of circulating immune cells, and development of atheroma. Although the process of atherogenesis is still not completely understood, inflammation plays a crucial role in all stages of atherosclerosis (Ross, 1999). As the most initial events, adhesion of circulating monocytes to the injured endothelial layer and their differentiation into macrophages, are critical for atherogenesis (Glass and Witztum, 2001; Price and Loscalzo, 1999). Monocyte adhesion is mainly controlled by the expression of cellular adhesion molecules, including intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Even in the absence of hypercholesterolemia, systemic microbial infection and plasma lipoproteins can induce an acute inflammatory process, which is closely related to atherosclerotic plaque formation (Millonig et al., 2002). Moreover, endothelial ICAM-1 and VCAM-1 are commonly up-regulated by the

proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF α) (Marui et al., 1993; Pober et al., 1986).

Myristica fragrans (nutmeg) has been used as a food spice and as a traditional oriental medicine against dysentery, diarrhea and pain (Grover et al., 2002). Sharma et al. demonstrated that nutmeg extracts lowered blood cholesterol levels and inhibited the hepatic accumulation of cholesterol, phospholipids and triglycerides in rabbits fed with high-fat diets (Sharma et al., 1995). In a previous study, we isolated seven 2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignans from total extracts of *M. fragrans*, and nectandrin B potently activated AMP-activated protein kinase (AMPK) at a concentration of 5 μ M in differentiated C2C12 myoblast cells. Moreover, administration of the lignan mixture significantly reduced weight gain in mice fed with high-fat diet (Nguyen et al., 2010). We also recently found that nectandrin B evoked endothelium-dependent relaxation via Ser 1177 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Hien et al., 2011). Considering these findings, it is plausible that nectandrin B could influence the pathological events of atherogenesis in endothelial cells.

Although the aforementioned reports focused on anti-hyperlipidemia and anti-obesity effects of nectandrin B, its effects on the expression of adhesion molecules and inflammation-related enzymes in endothelial cells have not been established. Accordingly,

* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 7851; fax: +82 2 872 1794.
E-mail address: kwkang@snu.ac.kr (K.W. Kang).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.052>
0278-6915/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



ORIGINAL ARTICLE

The *gpc* oncogenes, $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$, upregulate the transforming growth factor- $\beta 1$ gene

SJ Lee^{1,4}, JW Yang^{1,4}, IJ Cho¹, WD Kim¹, MK Cho^{1,2}, CH Lee³ and SG Kim¹

¹Innovative Drug Research Center for Metabolic and Inflammatory Disease, College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea; ²College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyungju, Korea and ³Department of Pharmacology and Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) plays a role in neoplastic transformation and transdifferentiation. $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$, referred to as the *gpc* oncogenes, stimulate mitogenic pathways. Nonetheless, no information is available regarding their roles in the regulation of the TGF $\beta 1$ gene and the molecules linking them to gene transcription. Knockdown or knockout experiments using murine embryonic fibroblasts and hepatic stellate cells indicated that a $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ deficiency reduced constitutive, auto-stimulatory or thrombin-inducible TGF $\beta 1$ gene expression. In contrast, transfection of activated mutants of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ enabled the knockout cells to promote TGF $\beta 1$ induction. A promoter deletion analysis suggested that activating protein 1 (AP-1) plays a role in TGF $\beta 1$ gene transactivation, which was corroborated by the observation that a deficiency of the G-proteins decreased the AP-1 activity, whereas their activation enhanced it. Moreover, mutation of the AP-1-binding site abrogated the ability of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ to induce the TGF $\beta 1$ gene. Transfection of a dominant-negative mutant of Rho or Rac, but not Cdc42, prevented gene transactivation and decreased AP-1 activity downstream of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$. In summary, $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ regulate the expression of the TGF $\beta 1$ gene through an increase in Rho/Rac-dependent AP-1 activity, implying that the G-protein-coupled receptor (GPCR)- $G\alpha_{12}$ pathway is involved in the TGF $\beta 1$ -mediated transdifferentiation process.

Oncogene (2009) 28, 1230–1240; doi:10.1038/onc.2008.488; published online 19 January 2009

Keywords: $G\alpha_{12}$ members; transforming growth factor- $\beta 1$; hepatic stellate cell; activating protein 1

Introduction

The members of the $G\alpha_{12}$ family, $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$, were initially isolated as the transforming *gpc* oncogenes (Xu *et al.*, 1993, 1994). Activated mutants of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ are extremely potent in inducing neoplastic transformation (Chan *et al.*, 1993; Dhanasekaran and Dermott, 1996; Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ regulate various cellular processes, such as cell transformation, proliferation, migration, actin-stress fiber formation, neurite retraction, platelet aggregation, gene induction and apoptosis in a context-specific manner (Kawanabe *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2007). They regulate small GTP-binding proteins (that is, the Ras and Rho family) through guanine nucleotide exchange factors and modulate the activity of transcription factors, including activating protein 1 (AP-1), serum response factor (SRF), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), nuclear factor of activated T cells (NFAT) and nuclear factor- κB (Kuner *et al.*, 2002; Kurose, 2003; Fujii *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006; Ki *et al.*, 2007). The ligands of the G-protein-coupled receptors (GPCRs) that interact with the $G\alpha_{12}$ family members, such as thrombin, angiotensin-II, endothelin-1/2 and thromboxane A_2 , contribute to transdifferentiation and proliferation, as well as hemodynamic alterations (Pinzani *et al.*, 1996; Bataller *et al.*, 2000; Graupera *et al.*, 2003; Fiorucci *et al.*, 2004).

Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) is a key mediator that regulates many cellular processes, including epithelial-mesenchymal transition, growth and extracellular matrix (ECM) formation (Friedman, 1993; Qi *et al.*, 1999; Bataller and Brenner, 2005; Zhao *et al.*, 2008). Although the role of TGF $\beta 1$ is very intriguing because it acts as both a tumor suppressor and a promoter of invasion and metastasis, it has also been reported that the level of TGF $\beta 1$ increased in both the blood and urine of hepatocellular carcinoma (HCC) patients, correlating with worsened prognosis and survival, and thus representing an important cancer marker (Giannelli *et al.*, 2005; Fransvea *et al.*, 2008). The TGF $\beta 1$ gene is known to be regulated at two levels as follows: transcriptional regulation is orchestrated by transcription factors, whereas post-translational regulation depends on the maturation of precursors bound to

Correspondence: Dr SG Kim, College of Pharmacy, Seoul National University, Silim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea.
E-mail: sgk@snu.ac.kr

⁴These authors contributed equally to this work.

Received 29 September 2008; revised 24 November 2008; accepted 9 December 2008; published online 19 January 2009

Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression

Mi Ra Kim,¹ Hong Seok Choi,¹ Jin Won Yang,¹
Byung Chul Park,² Jung-Ae Kim,²
and Keon Wook Kang¹

¹BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, South Korea and ²College of Pharmacy, Yeungnam University, Daegu, South Korea

Abstract

Acquired resistance to tamoxifen (TAM) is a serious therapeutic problem in breast cancer patients. Here, we found that TAM-resistant MCF-7 cells (TAMR-MCF-7 cells) produced higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) than control MCF-7 cells. Molecular analyses using reporter genes and Western blots supported the involvement of c-Jun/activator protein-1 and hypoxia-inducible factor 1 α in enhanced *VEGF* transcription in TAMR-MCF-7 cells. Pin1, a peptidyl prolyl isomerase, was consistently overexpressed in TAMR-MCF-7 cells, and c-Jun/activator protein-1-dependent *VEGF* transcription in TAMR-MCF-7 cells was almost completely inhibited by Pin1 siRNA and by the Pin1 inhibitor juglone. Chick chorioallantoic membrane assays confirmed that the increased angiogenic intensity of TAMR-MCF-7 cells was significantly suppressed by Pin1 inhibition. These results show that Pin1 overexpression is closely associated with VEGF-mediated angiogenesis and suggest that Pin1 is a potential therapeutic target of excessive angiogenesis in TAM-resistant breast cancer cases. [Mol Cancer Ther 2009;8(8):2163–71]

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in Western women and grows under hormone-dependent control. Ovarian steroid hormones, including estrogen, are critical not only in mammary gland development but also in breast carcinogenesis (1, 2). Hence, the use of antiestrogens, which have been shown to reduce breast tumor growth, has played a key role in the endocrine therapy of breast cancer.

The nonsteroidal antiestrogen tamoxifen (TAM) is the most widely used antiestrogen in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer patients (3). Although most patients are initially responsive, resistance to TAM develops, which is a critical problem for antiestrogen therapy (4). To mimic this condition, an MCF-7-derived TAM-resistant cell line (TAMR-MCF-7 cells) was established by long-term (>9 months) culture of MCF-7 cells with 4-hydroxytamoxifen (5, 6).

Angiogenesis, the formation of new vascular capillaries from preexisting vessels, is required for the growth of cancer because cancer cells experience hypoxic conditions due to high rates of proliferation and glycolysis (7). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a secreted glycoprotein specific for endothelial cells (8). VEGF secretion by cancer cells is essential for angiogenesis during carcinogenesis (9, 10) and also plays an essential role in transducing mitogenic signals (11). The expression level and the signaling activity of VEGF receptor 2 (Flk-1) are enhanced in TAM-resistant breast cancer cells (12). Moreover, overexpression of VEGF in estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells abolishes their estrogen-dependent growth phenotype and stimulates estrogen-independent growth in ovariectomized mice (13). These findings suggest that activated VEGF signaling may be associated with the estrogen independence of TAM-resistant breast cancer cells.

Microvessel counts are significantly higher in TAM-resistant breast tumor tissues compared with TAM-responsive tumor tissues in patients (14). Therefore, in the present study, we examined whether VEGF production and angiogenic potential were up-regulated in TAMR-MCF-7 cells and tried to analyze the underlying molecular mechanism. We found that both VEGF production and angiogenic activity were higher in TAMR-MCF-7 cells. We also revealed that enhanced *VEGF* gene transcription in TAMR-MCF-7 cells was dependent on the sustained activation of activator protein-1 (AP-1; mainly c-Jun) and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), and that overexpression of Pin1, a peptidyl prolyl isomerase, acted as a master regulator of angiogenesis through c-Jun/AP-1 activation in TAM-resistant breast cancer cells.

Materials and Methods

Materials

The anti-VEGF antibody was purchased from R&D Systems. JunB, c-Jun, c-Fos, Pin1, and HIF-1 α antibodies and c-Jun siRNA were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG, anti-goat IgG, and alkaline phosphatase-conjugated donkey anti-mouse IgG were purchased from Jackson

Received 11/21/08; revised 5/28/09; accepted 6/4/09; published OnlineFirst 8/11/09.

Grant support: SRC/ERC program of MOST/KOSEF Seoul National University, R11-2007-107-01002-0(2008) and R01-2007-000-20093-0.

Requests for reprints: Keon Wook Kang, College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, South Korea. Phone: 82-62-230-6368; Fax: 82-62-222-5414. E-mail: kwkang@chosun.ac.kr

Copyright © 2009 American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-1061

Mol Cancer Ther 2009;8(8). August 2009

Differential Regulation of ErbB2 Expression by cAMP-Dependent Protein Kinase in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells

Jin Won Yang, Mi Ra Kim, Hyung Gyoon Kim, Sang Kyum Kim¹, Hye Gwang Jeong, and Keon Wook Kang
BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea and ¹College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received September 28, 2007)

Acquired resistance to tamoxifen (TAM) is a serious therapeutic problem in breast cancer patients, and Her-2/ErbB2 expression is associated with decreased sensitivity to TAM. We previously reported that cAMP-dependent protein kinase (PKA)-mediated activator protein-2 (AP-2) activation was responsible for the expression of Her-2/ErbB2 in p53-inactivated mammary epithelial cells (Yang *et al.*, 2006). In the present study, we tested the hypothesis that PKA plays a role in the expression of ErbB2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. Treatment with H-89, a specific PKA inhibitor, suppressed 4-hydroxytamoxifen-induced ErbB2 expression in control MCF-7 cells. In contrast, PKA inhibition by H-89 or cAMP-dependent protein kinase inhibitor I_γ overexpression increased the expression levels of ErbB2 in TAM-resistant MCF-7 (TAMR-MCF-7) cells. Transcriptional regulation of the *erbB2* gene depends on two transcription factors, AP-2 and polyomavirus enhancer activator3 (PEA3). H-89 decreased nuclear or total levels of PEA3 in TAMR-MCF-7 cells. Chromatin immunoprecipitation assay results revealed that H-89 treatment reduced PEA3 binding to the proximal Ets binding site of the *erbB2* gene promoter. Reporter gene analyses using human *erbB2* gene promoter supported the critical role of PEA3 in the overexpression of ErbB2 in TAMR-MCF-7 cells treated with H-89. This deregulated PKA signaling cascades required for the ErbB2 expression may be important for the differential response of TAM-resistant breast cancer cells to EGF/ErbB2 stimuli.

Key words: Breast cancer, ErbB2, PEA3, PKA, Tamoxifen resistance

Abbreviations: 4-OH-TAM, 4-hydroxytamoxifen; AP-2, activator protein-2; ChIP, Chromatin Immunoprecipitation; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EGFR, epidermal growth factor receptor; FBS, fetal bovine serum; PEA3, polyomavirus enhancer activator3; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PKI, cAMP-dependent protein kinase inhibitor I; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; SDS, sodium dodecylsulfate; TAM, tamoxifen; TAMR-MCF-7 cells, MCF-7 derived TAM-resistant cells

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy in Western women. Breast cancer is characterized by hormone-dependent proliferation. Since ovarian steroid hormones, including estrogen, are critical both in mammary gland development and breast carcinogenesis (Petrangeli *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 2002), a non-steroidal antiestro-

gen, tamoxifen (TAM), is approved for the chemoprevention of breast cancer and is the most widely used anti-estrogen in estrogen receptor-positive breast cancer patients (Rose *et al.*, 1985). Although most patients are initially responsive, the acquisition of resistance to TAM is a significant problem in anti-estrogen therapy (Clemons *et al.*, 2002).

Activational mutations of oncogenes also play a key role in breast carcinogenesis. One of the most important activational mutations involves the *ErbB2/HER-2/neu* gene, which is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family of tyrosine kinase receptors. An anti-ErbB2 neutralizing antibody, Herceptin, has been approved both

Correspondence to: Keon Wook Kang, College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-6368, Fax: +82-62-222-5414
E-mail: kwkang@chosun.ac.kr



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology & Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells

Sang Kyum Kim ^{a,1}, Jin Won Yang ^{b,1}, Mi Ra Kim ^b, Sang Hee Roh ^b, Hyung Gyun Kim ^b, Kwang Youl Lee ^c, Hye Gwang Jeong ^b, Keon Wook Kang ^{b,*}^a College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon, South Korea^b BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea, South Korea^c College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2007

Revised 8 May 2008

Accepted 15 May 2008

Available online 24 May 2008

Keywords:

Anti-oxidant proteins

ARE

ERK

 γ -glutamylcysteine ligase

Nrf2

Tamoxifen resistance

ABSTRACT

Acquired resistance to tamoxifen (TAM) is a serious therapeutic problem in breast cancer patients. In this study, we found that the expressions of anti-oxidant proteins (γ -glutamylcysteine ligase heavy chain (γ -GCL_h), heme oxygenase-1, thioredoxin and peroxiredoxin1) in TAM-resistant MCF-7 (TAMR-MCF-7) cells were higher than control MCF-7 cells. Molecular analyses using antioxidant response element (ARE)-containing reporters and gel-shift supported the critical role of NF-E2-related factor2 (Nrf2)/ARE in the overexpression of antioxidant proteins in TAMR-MCF-7 cells. Intracellular peroxide production was significantly decreased in TAMR-MCF-7 cells and TAM resistance was partially reversed by Nrf2 siRNA. The basal phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase were increased in the TAMR-MCF-7 cells and the inhibition of ERK significantly decreased the activity of minimal ARE reporter and γ -GCL_h protein expression in TAMR-MCF-7 cells. However, exposure of TAMR-MCF-7 cells to 17- β -estradiol or ICI-182,780 did not significantly change γ -GCL_h expression. These results suggest that the persistent activation of Nrf2/ARE is critical for the enhanced expression of anti-oxidant proteins in TAM-resistant breast cancer cells and the pathway of ERK, but not of estrogen receptor signaling are involved in the up-regulation of Nrf2/ARE.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in Western women. The ability to reduce breast tumor growth through the administration of anti-estrogens has played a key role in the endocrine therapy of breast cancer. A non-steroidal antiestrogen, tamoxifen (TAM), is the most widely used antiestrogen in estrogen receptor-positive breast cancer patients [1]. Although most patients are initially responsive, resistance to TAM is a critical problem for anti-estrogen therapy [2].

To establish a TAM-resistant breast cancer cell line, Gottardis and Jordan [3] administered tamoxifen long-term to nude mice bearing MCF-7 cells, and the isolated MCF-7 cells became tamoxifen-resistant. In addition, continuous culture of human breast cancer cell lines with tamoxifen leads to the development of tamoxifen-resistant cell lines. Long-term culture of MCF-7 cells with tamoxifen or 4-hydroxytamoxifen also results in the formation of TAM-resistant cells [4,5]. We have also established an MCF-7 derived TAM-resistant cell line (TAMR-MCF-7 cells) by long-term (> 9 months) culture of MCF-7 cells with 4-hydroxytamoxifen [6].

Cancer cells can resist oxidative stress by the rapid induction of ROS-protecting enzymes. Glutathione (GSH) is a non-protein sulfhydryl small molecule that scavenges free radicals and electrophiles [7]. γ -glutamylcysteine ligase (GCL), which is composed of two subunits, a catalytic heavy chain (γ -GCL_h) and a regulatory light chain (γ -GCL_l), is the rate-limiting enzyme for the biosynthesis of GSH [8]. Both γ -GCL subunits are induced by oxidative stress, including phenolic antioxidants, radicals, and GSH depletion via the activation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) or nuclear factor- κ B [9–11]. In addition to GSH, thioredoxin is ubiquitously expressed thiol-reducing antioxidant system [12]. Cysteine-containing peroxiredoxins also represent a new type of peroxidase and these are coupled with thioredoxin and thioredoxin reductase [13]. Recent studies have also shown that the expression of thioredoxin or peroxiredoxin 1 is

Abbreviations: 4-OH-TAM, 4-hydroxytamoxifen; ARE, antioxidant response element; BSO, DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine; DCF, dichlorofluorescein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; γ -GCL, γ -glutamylcysteine ligase; HO-1, heme oxygenase-1; MKK1, mitogen-activated protein kinase kinase 1; MRP, multidrug resistance associated protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; Nrf2, NF-E2-related factor 2; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; ROS, reactive oxygen species; SDS, sodium dodecylsulfate; TAM, tamoxifen; TAMR-MCF-7, tamoxifen-resistant MCF-7.

* Corresponding author. Fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).¹ These two authors contributed equally to this work.

0891-5849/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.011

Induction of Glutathione Transferase in Insulin-Like Growth Factor Type I Receptor-Overexpressed Hepatoma Cells

Jeong Yong Lee, Chang Yeob Han, Jin Won Yang, Christopher Smith, Sang Kyum Kim, Eva Y.-H. P. Lee, Sang Geon Kim, and Keon Wook Kang

BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, South Korea (J.Y.L., C.Y.H., J.W.Y., K.W.K.); Departments of Biological Chemistry/Developmental and Cell Biology, University of California at Irvine, Irvine, California (E.Y.H.-P.L., C.S.); College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, South Korea (S.K.K.); and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, South Korea (S.G.K.)

Received May 16, 2007; accepted July 5, 2007

ABSTRACT

Insulin-like growth factor type I receptor (IGF-IR) is frequently overexpressed in human hepatocellular carcinoma cells (HCC), and this overexpression has been correlated with increased tumor growth. The protective response of HCC to reactive oxygen species (ROS) produced by chemotherapeutic agents is mediated with the induction of phase II detoxifying genes including glutathione transferase (GST). To understand the roles of IGF-IR overexpression in HCC in terms of its detoxifying effect on ROS and conferred resistance to chemotherapy, we analyzed whether IGF-IR overexpressions affect IGF-1-inducible GST expression. GST α was induced by exposure to IGF-1 in IGF-IR cells but not in cells expressing normal levels of IGF-IR. Furthermore, IGF-IR-overexpressed HCCs (IR-HCC) are more resistant to doxorubicin than control HCC cells, which was associated with the increased GST induction by IGF-1. Molecular analyses using GSTA2 promoter supported the in-

volvement of xenobiotic response element (XRE) in GST α induction. IGF-1 caused the nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β), which might be responsible for XRE activation. In addition, IGF-1 increased the activities of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) and extracellular signal-regulated kinase in IR-HCCs. Moreover, the inhibition of PI3-kinase completely abolished the nuclear translocation of C/EBP β and the up-regulation of GST α protein in IR-HCC treated with IGF-1. However, specific inhibitors against extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, or p38 kinase did not alter IGF-1-inducible GST α expression. These results provide evidence that one of the pathological consequences of IGF-IR overexpression in HCCs is the potentiation of GST α inducibility by IGF-1. Moreover, this potentiation of GST may be associated with decreased susceptibility to chemotherapeutic agents such as doxorubicin.

Hepatocellular carcinoma is the fifth most common malignant tumor worldwide. Hepatomas are likely to rise from normal cells through the accumulation of multiple genetic changes, which include the functional loss of tumor suppressor genes and the presence of activating oncogene mutations.

In addition to genetic changes in these genes, the expressions of growth factor receptors are up-regulated in hepatocellular carcinoma cells (HCC) (Yamaguchi et al., 1995; Scharf and Braulke, 2003). One of the growth factors predominantly implicated in hepatocarcinogenesis is insulin-like growth factor-1 (IGF-1). IGFs are synthesized and secreted by hepatocytes, and the interaction of IGF-1 with its receptor, IGF type I receptor (IGF-IR), plays a central role in the proliferation of a variety of cell types (Pietrzkowski et al., 1993; Scharf et al., 2001). Differentiated hepatocytes are not believed to be a major target for the actions of IGF-I, because only a few

This work was financially supported by a Korean Research Foundation grant (KRF-2004-E00037).

J.Y.L., C.Y.H., and J.W.Y. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
 doi:10.1124/mol.107.038174.

ABBREVIATIONS: HCC, hepatocellular carcinoma cells; ARE, antioxidant response element; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; GST, glutathione transferase; IGF, insulin-like growth factor; IGF-IR, insulin-like growth factor type I receptor; IR-HCC, insulin-like growth factor type I receptor-overexpressed hepatocellular carcinoma cells; NBT, nitroblue tetrazolium; Nrf2, NF-E2-related factor 2; MAP, mitogen-activated protein; PBS, phosphate-buffered saline; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; ROS, reactive oxygen species; XRE, xenobiotic response element; ERK, extracellular signal-regulated kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MKK1, mitogen-activated protein kinase kinase 1; GFP, green fluorescent protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; LY294002, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride; U0126, 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene; SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole; SP600125, anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one 1,9-pyrazoloanthrone.

Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells

Hoo Kyun Choi, Jin Won Yang, Sang Hee Roh, Chang Yeob Han and Keon Wook Kang

BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, South Korea

(Requests for offprints should be addressed to K W Kang; Email: kwkang@chosun.ac.kr)

H K Choi and J W Yang contributed equally to this work

Abstract

Acquired resistance to tamoxifen (TAM) is a serious therapeutic problem in breast cancer patients. The transition from chemotherapy-responsive breast cancer cells to chemotherapy-resistant cancer cells is mainly accompanied by the increased expression of multidrug resistance-associated proteins (MRPs). In this study, it was found that TAM-resistant MCF-7 (TAMR-MCF-7) cells expressed higher levels of MRP2 than control MCF-7 cells. Molecular analyses using *MRP2* gene promoters supported the involvement of the pregnane X receptor (PXR) in *MRP2* overexpression in TAMR-MCF-7 cells. Although CCAAT/enhancer-binding protein β was overexpressed continuously in TAMR-MCF-7 cells, this might not be responsible for the transcriptional activation of the *MRP2* gene. In addition, the basal activities of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) were higher in the TAMR-MCF-7 cells than in the control cells. The inhibition of PI3-kinase significantly reduced both the PXR activity and *MRP2* expression in TAMR-MCF-7 cells. Overall, *MRP2* induction plays a role in the additional acquisition of chemotherapy resistance in TAM-resistant breast cancer.

Endocrine-Related Cancer (2007) 14 293–303

Introduction

Chemotherapy is the most widely applied tool for treating metastatic tumors. However, its success is limited by the ability of cancer cells to acquire chemoresistance to a broad range of anti-cancer agents. Multidrug resistance (MDR) in cancer is a phenomenon of resistance to a number of structurally different chemotherapeutic agents after exposure to one anti-cancer agent. One of the most important reasons for cancer chemotherapy resistance is the increased expression of the drug transporters that causes the efflux of the chemotherapeutic agents from the cancer cells (Gottesman *et al.* 2002). The ATP-binding cassette (ABC) transporter family includes ABCB1 (*P*-glycoprotein, *P*-gp, or MDR1), ABCC1 (MDR-associated protein 1, MRP1), and ABCC2 (MRP2, or cMOAT). These transporters are believed to be involved in the efficient pumping of a drug out of the cell, and there is an inverse correlation between

their functional expression and the chemotherapy response in various cancers (Kool *et al.* 1997, van Tellingen *et al.* 2003). Among the ABC transporters, MRP2 is a 190 kDa phosphoglycoprotein that is localized in the apical membrane of cancer cells and is involved in the transport of either xenobiotics including chemotherapeutic agents (e.g. cisplatin, anthacyclines, vinca alkaloids, and methotrexate) or various conjugated metabolites (Paulusma *et al.* 1996, Kawabe *et al.* 1999, Schrenk *et al.* 2001).

Breast cancer is the most common malignancy in western women. The ability to reduce breast tumor growth through the administration of anti-estrogens has played a key role in the endocrine therapy of breast cancer. A non-steroidal anti-estrogen, tamoxifen (TAM), is a representative drug that has been approved for the chemoprevention of breast cancer and is the most widely used anti-estrogen in estrogen receptor-positive breast cancer patients (Rose *et al.* 1985).



Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase

Jin Won Yang ^a, Se Young Yoon ^{a,b}, Soo Jin Oh ^c, Sang Kyum Kim ^c, Keon Wook Kang ^{a,*}

^a College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, South Korea

^b LG Household and Healthcare Ltd., Research Park, Daejeon, South Korea

^c College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon, South Korea

Received 19 May 2006

Available online 2 June 2006

Abstract

Algal fucoidan is a marine sulfated polysaccharide with a wide variety of biological activities including anti-thrombotic and anti-inflammatory effects. This study evaluated the effect of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a macrophage cell line, RAW264.7. Low concentration range of fucoidan (10 µg/ml) increased the basal expression level of iNOS in quiescent macrophages. However, we found for the first time that fucoidan inhibited the release of nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Western blot analysis revealed that fucoidan suppressed the LPS-induced expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. Moreover, the activation of both nuclear factor-κB (NF-κB) and activator protein 1 (AP-1) are key steps in the transcriptional activation of the iNOS gene. Here, it was revealed that fucoidan selectively suppressed AP-1 activation, and that the activation of AP-1 appears to be essential for the induction of iNOS in activated macrophages. This inhibitory effect on AP-1 activation by fucoidan might be associated with its NO blocking and anti-inflammatory effects.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: AP-1; Fucoidan; iNOS; Macrophages; Nitric oxide

Algal fucoidan, which is extracted from brown algae (e.g., *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*), is a marine sulfated polysaccharide that is endowed with important biological activities including anti-viral, anti-angiogenic, anti-tumoral, contraceptive, anti-thrombotic, anti-coagulant, and anti-inflammatory effects [1]. The brown seaweed, *Laminaria japonica* Aresch. (Laminariales), is distributed widely in East Asia and is consumed as a marine vegetable. Fucoidan, one of its main constituents, is also available as food supplement in Japan and United States.

Fucoidan contains a substantial percentage of L-fucose and sulfate ester groups, and the structural characteristics of fucoidan are very similar to those of heparin.

Therefore, it exhibits potent anti-thrombotic activity [1]. Another outstanding physiological function of fucoidan is anti-inflammatory properties through anti-complementary [2], anti-leukocyte migration [3] and anti-proliferation effects on smooth muscle cell [4]. In addition, fucoidan as a ligand for the macrophage scavenging receptor 1 (MSR1) increased the level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1 secretion [5]. It was recently reported that fucoidan increases the level of nitric oxide (NO) production in quiescent macrophages, which was related with p38 kinase-dependent NF-κB activation [6].

Although several studies on the biological activities of fucoidans have been performed, with particular focus on its immunomodulatory actions, it is unclear if fucoidan affects the formation of NO in lipopolysaccharide (LPS; endotoxin, a representative Toll-like receptor 4 agonist)-stimulated macrophages. This study we unexpectedly

* Corresponding author. Fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).



Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*

Jin Won Yang^a, Yuba Raj Pokharel^a, Mi-Ran Kim^a, Eun-Rhan Woo^a,
Hoo Kyoong Choi^{a,b}, Keon Wook Kang^{a,*}

^a College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

^b Research Center for Resistant Cells, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

Received 13 May 2005; received in revised form 3 October 2005; accepted 7 October 2005

Available online 10 November 2005

Abstract

We previously reported that amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina* inhibits the production of nitric oxide (NO) in macrophages via nuclear factor- κ B (NF- κ B) inactivation. Here, we isolated two other bi-flavonoid compounds (sumaflavone and robustaflavone) from *Selaginella tamariscina* and studied their effects on inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression. Sumaflavone inhibited NO production in a concentration-dependent manner and blocked the lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of iNOS. In contrast, robustaflavone only marginally affected iNOS gene expression and NO production. To identify the transcriptional factors affected by sumaflavone, we investigated NF- κ B and AP-1 activation. Reporter gene analysis using AP-1-specific luciferase reporter and gel shift analysis showed that enhanced AP-1 activity by LPS was significantly diminished in macrophages pretreated with sumaflavone. However, sumaflavone did not inhibit LPS-inducible NF- κ B reporter activity. Western blot analyses also confirmed that the extent of I- κ B α phosphorylation and the nuclear level of p65 were unaffected by sumaflavone. These results suggest that the inhibitory effect of sumaflavone on AP-1 activation may be associated with the potent NO blocking and anti-inflammatory effects of *Selaginella tamariscina* extract.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: AP-1; iNOS; Nitric oxide; *Selaginella tamariscina*; Sumaflavone

1. Introduction

The roles of antioxidants in the prevention of reactive oxygen species (ROS)-induced cytotoxicity and tissue damage in various human diseases are becoming increasingly recognized. Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) in various types of cells. Of the three isoforms of NOS, only one, inducible nitric oxide synthase (iNOS), is inducible. iNOS is synthesized in immune cells that have been activated by lipopolysaccharide (LPS) or cytokines. Moreover, the large quantity of NO produced by iNOS in activated macrophages is one of the most important inflammatory mediators. Physiologically, NO induces various harmful responses,

including tissue injury and sepsis (Strunk et al., 2001; Nagai et al., 2003). Hence, it would be valuable to find a potential antioxidant that counteracts the effects of NO. Recently, we found that a bi-flavonoid, amentoflavone, potently suppresses NO production in macrophages treated with LPS, and we determined that this effect is associated with the transcriptional inhibition of the iNOS gene via nuclear factor- κ B (NF- κ B) inactivation (Woo et al., 2005). As part of our on-going program designed to screen potential anti-inflammatory compounds from medicinal plants, we isolated two different bi-flavonoids (sumaflavone and robustaflavone, Fig. 1A and B) from the ethylacetate fraction of *Selaginella tamariscina*.

The leaves of *Selaginella tamariscina* are used in oriental medicine, and have been reported to lower blood glucose levels and to facilitate the repair of pancreatic islet B cells injured by alloxan (Miao et al., 1996). In addition, crude extracts of *Selaginella tamariscina* were found to reduce the production of proinflammatory cytokines, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human mesangial cells (Kuo et al., 1998).

Abbreviations: AP-1, activator protein-1; I- κ B α , inhibitor- κ B α ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; ROS, reactive oxygen species; SDS, sodium dodecyl sulfate

* Corresponding author. Tel.: +82 62 230 6368; fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).

ErbB2 overexpression in p53-inactivated mammary epithelial cells

Jin Won Yang^a, Eva Y.-H.P. Lee^b, Keon Wook Kang^{a,*}

^a BK21 Project Team, College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, South Korea

^b Department of Biological Chemistry and Department of Cell Biology, University of California Irvine, CA 92697, USA

Received 20 September 2006; revised 13 October 2006; accepted 26 October 2006

Available online 3 November 2006

Edited by Varda Rotter

Abstract Functional loss of p53 and ErbB2 overexpression are the frequent genetic alterations in human breast carcinomas. Here, we found that ErbB2 expression was upregulated in primary cultured mammary epithelial cells (MECs) isolated from mice with a defect in exons 5 and 6 of the p53 gene (p53^{Δ5,6}). The reporter gene activity in the p53^{Δ5,6} MECs transfected with the –756 bp flanking region of the *hErbB2* gene was higher than the wild type MECs. p53 inactivation selectively increased the level of AP-2α, but not AP-2β and AP-2γ and a mutation of the two AP-2 binding sites completely inhibited the reporter activity.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: p53; ErbB2; AP-2α; Mammary epithelial cell; Protein kinase A

1. Introduction

Breast cancer is one of the most common malignancies in Western women. Human breast tumors arise from normal cells as a result of the accumulation of multiple mutations of tumor suppressor genes such *BRCA* and *p53* [1]. p53 is a transcription factor that controls the cellular stress response [2,3]. A defect in the function of p53 is the most frequent genetic alteration in human tumors. Germ-line mutations of p53, which are predominantly amino acid substitutions within the DNA binding domain, have been linked to 70% of families with Li–Fraumeni syndrome. These patients have a high risk of early-onset breast cancers as well as other tumors [4,5]. Indeed, a mutation of the p53 gene is frequently found in human breast carcinomas. Approximately 30–50% of breast cancers carry a mutation in the p53 gene and show p53 protein expression by immunohistochemistry [6].

Activational mutations of oncogenes also play a key role in breast carcinogenesis. One of the most important activational mutations involves the *ErbB2/HER-2/neu* gene, which is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family of tyrosine kinase receptors. The overexpression of ErbB2 is a common event in breast cancer [7]. An inverse relationship between the estrogen response and EGFR/ErbB2 expression in clinical breast cancer has been reported, with ErbB2 overexpression being associated with a decreased sensitivity to anti-estrogen (tamoxifen) therapy and a poor prognosis

[8,9]. Herceptin (Trastuzumab®), which is anti-ErbB2 monoclonal antibody, has been shown to be active as either a single agent or in combination with chemotherapy for ErbB2-positive metastatic breast cancer [10]. Moreover, it is also useful in diminishing the level of tamoxifen resistance of breast cancer [11,12]. Hence, the expression levels of the *ErbB2* gene are closely related to successful chemotherapy against breast cancer.

Previously, two lines of mouse models of breast cancer were established by the conditional knockout of p53 genes through the Cre–loxP recombination system in the mammary glands of mice [13]. In this system, two lines of mice are required: one carrying the floxed p53 alleles (p53^{flp/tp}) and the other expressing Cre recombinase under the regulation of the whey acidic protein (WAP) promoter (WAP–Cre). Cre expression leads to a recombination within the loxP sequences placed within introns 4 and 6 of the p53 gene, which results in a deletion of a part of the DNA binding domain (exons 5 and 6) of p53 that inactivates the gene (p53^{Δ5,6}). It was found that many characteristics of these mouse models resemble human breast cancer. In particular, the expression levels of the *ErbB2* gene were obviously increased in the mammary tumor lysates obtained from the p53^{Δ5,6} mice [13]. In clinical studies, ErbB2 overexpression in breast cancer tissues, which is associated with increased proliferation, is often observed in tumors with p53 alterations [14].

Despite both p53 and ErbB2 being crucial factors for the pathological progress of breast cancer, the precise role of p53 in ErbB2 expression during mammary tumorigenesis is unclear. This paper shows for the first time that ErbB2 expression is upregulated in mammary epithelial cells (MEC) from p53^{Δ5,6} mice, in which the induction of AP-2α through the sustained activation of protein kinase A (PKA) is a key step.

2. Materials and methods

2.1. Materials

U0126 was supplied by Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-AP-2β and AP-2γ antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The antibodies against AP-2α, p53 and ErbB2 were obtained from Upstate Inc. (Charlottesville, VA), Novocastra Laboratory Ltd. (Newcastle, UK) and DakoCytomation (Glostrup, Denmark), respectively. The alkaline phosphatase and horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat IgGs were acquired from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium and pRL-SV40 plasmid were purchased from Promega (Madison, WI). The H-89 was supplied by Calbiochem (La Jolla, CA). The anti-actin antibody and the other reagents in the molecular studies were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The plasmids, p756-Luc construct containing 756 bp in the *hErbB2*-promoter region

*Corresponding author. Fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).

Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation by 2',8''-Biapigenin

Eun-Rhan Woo, Yuba Raj POKHAREL, Jin Won YANG, Song Yi LEE, and Keon Wook KANG*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501–759, South Korea.

Received November 15, 2005; accepted January 28, 2006

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) play a key role in the inflammatory processes. Improper overproduction of NO and prostaglandins by both enzymes are also believed to be involved in the pathogenesis of certain human cancers. Crude extracts of *Selaginella tamariscina* are used as an oriental medicine, which has been reported to inhibit the production of proinflammatory cytokines and cause cell cycle arrest. We isolated 2',8''-biapigenin from *S. tamariscina* and investigated whether it modulates iNOS and COX-2 expressions in Raw264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). We found that 2',8''-biapigenin blocked the transactivations of iNOS and COX-2 genes via the inactivation of nuclear factor- κ B by preventing the nuclear translocation of p65. Hence, it may be possible to develop *S. tamariscina* extracts or 2',8''-biapigenin as a useful agent for cancer chemoprevention or for the treatment of inflammatory diseases.

Key words: 2',8''-biapigenin; cyclooxygenase (COX)-2; inhibitor- κ B α ; inducible nitric oxide synthase (iNOS); nuclear factor (NF)- κ B; *Selaginella tamariscina*

Chemoprevention is considered to be one of the most promising strategies for the prevention of human cancers. It is defined as the use of either natural or synthetic compounds to block or retard the carcinogenic process, and many natural candidates including epigallocatechin, genistein and sulforaphane have been evaluated in terms of malignancy prevention.^{1–3)}

Recently, it was suggested that chronic inflammation is associated with carcinogenesis.^{4,5)} Chronic inflammation leads to the induction of specific enzymes in affected tissues and cells. In particular, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are responsible for the exaggerated production of NO and prostaglandins, respectively, and are believed to be involved in the pathogenesis of cancer.^{6,7)} COX-2 expression increases during tumor progression in the stomach, suggesting that COX-2 participates in gastric tumorigenesis.⁸⁾ It has also been reported that there is a strong positive relationship between the presence of iNOS and the frequency of mutation in colon tumor tissues.⁹⁾ Hence, the overproduction of prostaglandins and NO may act as both an endogenous initiator and as a promoter of carcinogenesis and specific inhibitors of COX-2 or iNOS might have applications as chemopreventive agents in human cancer.

Lee *et al.*¹⁰⁾ reported that the water-extracted fraction of *Selaginella tamariscina* (Selaginellaceae) efficiently increased p53 gene expression and induced G1 arrest, suggesting that *S. tamariscina* is a candidate chemopreventive. Crude extracts of *S. tamariscina* also reduced the production of proinflammatory cytokines, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α in human mesangial cells.¹¹⁾ As a part of our program to screen for potential cancer chemopreventive compounds from medicinal plants, we isolated 2',8''-biapi-

genin from *S. tamariscina* (Fig. 1). The biological activity of 2',8''-biapigenin has not been studied.

In the present study, we investigated the modulating effects of the bi-flavonoid, 2',8''-biapigenin on the expressions and activities of iNOS and COX-2 induced by lipopolysaccharide (LPS) in Raw264.7 macrophage cells. We found that 2',8''-biapigenin inhibited nuclear factor (NF)- κ B activation, and that this action is required for its blocking effects on iNOS and COX-2.

MATERIALS AND METHODS

Extraction and Isolation of 2',8''-Biapigenin Whole *Selaginella tamariscina* (600 g) was extracted with MeOH at room temperature to afford 50.5 g of residue. The methanol extract was suspended in water and then sequentially partitioned in dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol. Three grams of the EtOAc fraction was subjected to silica gel column chromatography using a CHCl₃–MeOH–H₂O (12:1:0.1→8:1:0.1→5:1:0.1→2:1:0.1→1:1:0.1→MeOH only) gradient elution system. Fractions were combined based on their TLC patterns to yield subfractions designated as E1–E10. Subfraction E4 (438.9 mg) was purified by Sephadex LH 20 column chromatography using MeOH:H₂O=2:1 as eluant to give four subfractions (E41–E44). Subfraction E44 (196.5 mg) was finally purified by MCI gel column chromatography to afford 2',8''-biapigenin (25.0 mg). The physical, chemical, and ¹H-, ¹³C-NMR, and HSQC data of 2',8''-biapigenin were identical with that previously reported.¹²⁾

Materials 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate and nitroblue tetrazolium were supplied by Life Technologies (Gaithersburg, MD, U.S.A.); anti-murine iNOS antiserum by Transduction Laboratories (Lexington, KY, U.S.A.); and anti-COX-2 and c-Rel (p65) antibodies by Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and alkaline phosphatase-conjugated donkey anti-mouse IgGs were purchased from Jackson ImmunoResearch laboratories (West Grove, PA, U.S.A.). Most of the reagents used during the molecular studies were obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

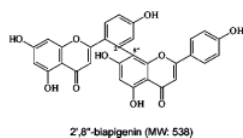


Fig. 1. Structure of 2',8''-Biapigenin Isolated from *Selaginella tamariscina* (Selaginellaceae)

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kwkang@chosun.ac.kr



Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone

Yuba Raj Pokharel^a, Jin Won Yang^a, Ji Young Kim^a, Hyun Woo Oh^b, Hye Gwang Jeong^a, Eun-Rhan Woo^a, Keon Wook Kang^{a,*}

^a College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

^b Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-333, South Korea

Received 15 September 2005; revised 21 December 2005

Available online 20 February 2006

Abstract

The improper productions of nitric oxide and prostaglandins following the inductions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are involved in the pathogenesis of chronic inflammation. *Selaginella tamariscina* is used as an oriental medicine for its anti-inflammatory effects. Here, we isolated taiwaniaflavone from *S. tamariscina* and investigated whether taiwaniaflavone affects the induction of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. We found that taiwaniaflavone blocks the transactivations of *iNOS* and *COX-2* genes by blocking the nuclear translocation of p65 and subsequent nuclear factor- κ B inactivation. It is known that NF- κ B activation is controlled by the phosphorylation and subsequent degradation of I- κ B α , and in the present study, we found that the phosphorylation and degradation of I- κ B α were also inhibited by taiwaniaflavone. Our findings indicate that taiwaniaflavone may provide a developmental basis for an agent against inflammatory diseases.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: COX-2; iNOS; NF- κ B; *Selaginella tamariscina*; Taiwaniaflavone

The leaves of *Selaginella tamariscina*, which are used in oriental medicine, have been reported to lower blood glucose levels and facilitate the repair of pancreatic islet B cells injured by alloxan [1]. Crude extracts of *S. tamariscina* also reduced the productions of proinflammatory cytokines, e.g., interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human mesangial cells [2]. In the present study, we isolated a biflavonoid, taiwaniaflavone from the ethylacetate fraction of *S. tamariscina*. Taiwaniaflavone has been isolated from several plants (e.g., *Taiwania cryptomerioides* Hayata) [3,4], but its pharmacological activities have not been studied.

Nitric oxide (NO)¹ plays beneficial and detrimental roles during inflammation. NO produced by constitutive

NOS forms (cNOS, or NOS types I or III) is essential for maintaining cellular function [5], whereas NO produced by inducible NOSs (iNOS, NOS type II) is an important mediator of acute and chronic inflammation [6], and contributes to the pathogenesis of organ failure in circulatory shock [7]. Moreover, cyclooxygenase-2 (COX-2) is also involved in pathology of chronic inflammation. COX-2 is an inducible enzyme, and is induced by lipopolysaccharide (LPS) and by several cytokines [8]. Thus, COX-2 is a plausible target for the prevention or treatment of chronic inflammatory disorders, and the development of the effective COX-2 specific inhibitor Celecoxib represented a major advance in the treatment of inflammatory processes [9].

In the present study, we investigated the modulatory effects of the bi-flavonoid taiwaniaflavone on the expressions and activities of iNOS and COX-2 induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macrophage cells. We found that taiwaniaflavone inhibited NF- κ B activation by

* Corresponding author. Fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).

¹ Abbreviations used: COX; cyclooxygenase; I- κ B α , inhibitor- κ B α ; LPS, lipopolysaccharide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; SDS, sodium dodecyl sulfate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters 242 (2006) 198–206

CANCER
Letters

www.elsevier.com/locate/canlet

Bifunctional effect of resveratrol on the expression of ErbB2 in human breast cancer cell

Hoo Kyoong Choi^{a,b,1}, Jin Won Yang^{b,1}, Keon Wook Kang^{b,*}

^a Research Center for Resistant Cells, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

^b College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, South Korea

Received 28 September 2005; received in revised form 1 November 2005; accepted 4 November 2005

Abstract

This study evaluated the effect of resveratrol on the expression of ErbB2 in a human breast cancer cell line, MCF-7. Low concentrations of resveratrol (1–10 μ M) reduced the basal expression level of ErbB2 in MCF-7 cells cultured in an estrogen-free medium. When cells were cultured in a medium containing estrogen, resveratrol increased the ErbB2 protein levels in a dose-dependent manner. Resveratrol increased the luciferase reporter gene activity in cells transfected with the –756 bp flanking region of the human *erbB2* gene. Resveratrol increased the nuclear levels of AP-2 α and AP-2 γ , and the induction of the luciferase reporter gene by resveratrol was inhibited by a mutation of two AP-2 binding sites in the promoter region of the human *erbB2* gene. Blocking the ERK, p38 kinase or PI3-kinase activity had no effect on the resveratrol-inducible transactivation of the *erbB2* gene and the ErbB2 expression level.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: AP-2; Breast cancer; ErbB2; Estrogen; Resveratrol

1. Introduction

Resveratrol is a natural polyphenolic stilbene derivative that is found in grapes and other food products [1]. It is the principal pharmacologically active component of red wine whose intake is inversely related to the incidence of chronic diseases such as cardiovascular disorders and cancer [2,3]. In the aspect of its cancer preventive action, several studies have reported that resveratrol helps block tumor cell proliferation, promotes tumor cell apoptosis and interferes with the progression of cancer cells [4–6].

Breast cancer is the most common malignancy in Western women. Human breast tumors arise from normal cells via the accumulation of multiple mutations of various tumor suppressor genes such as *BRCA* and *p53* [7]. Activational mutations of various oncogenes also play an important role in breast carcinogenesis. One of the most important activational mutations involves the *erbB2*/*HER-2/neu* gene, which is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family of tyrosine kinase receptors. There is an inverse relationship between estrogen response and EGFR/ErbB2 expression in clinical breast cancer, with ErbB2 overexpression being associated with a decreased sensitivity to anti-estrogen (tamoxifen) therapy and a poor prognosis [8]. ErbB2 overexpression is a frequent event in breast cancer [9], which is also believed to be involved in the acquisition of tamoxifen-resistance [10]. Herceptin (Trastuzumab®), which is an anti-ErbB2

* Corresponding author. Tel: +82 62 230 6368; fax: +82 62 222 5414.

E-mail address: kwkang@chosun.ac.kr (K.W. Kang).

¹ These two authors equally contributed to this work.